

BERICHTE
aus dem
INSTITUT FÜR MEERESKUNDE
an der
CHRISTIAN-ALBRECHTS-UNIVERSITÄT · KIEL

Nr. 145

Auswirkungen
von Salzgehalts- und Temperaturänderungen
auf die
Extrazelluläre Enzymaktivität
marin-pelagischer Mikroorganismen

von

P. NIESSLBECK, M. VOIGT, S. J. KIM,
G. BOLMS, H.-G. HOPPE

1985

**AUSWIRKUNGEN VON
SALZGEHALTS- UND TEMPERATURAENDERUNGEN
AUF DIE EXTRAZELLULAERE ENZYMAKTIVITAET
MARIN-PELAGISCHER MIKROORGANISMEN.**

VON

P. NIESSLBECK	(Abt.: Fischereibiologie)
M. VOIGT	(Abt.: Fischereibiologie)
S.-J. KIM	(Abt.: Marine Mikrobiologie)
G. BOLMS	(Abt.: Marine Planktologie)
H.-G. HOPPE	(Abt.: Marine Mikrobiologie)

INHALTSVERZEICHNIS:

Kapitel:	Inhalt:	Seite:
<hr/>		
0.0	Abstract	
1.0	Einleitung	1 - 3
2.0	Material und Methoden	3 - 6
3.0	Ergebnisse	6 - 49
3.1	Ergebnisse der Vorversuche	6 - 12
3.2	Ergebnisse der Hauptversuche	12 - 49
3.2.1	Ergebnisse der Versuche bei insitu-Salzgehalten	12 - 22
3.2.2	Ergebnisse der Versuche mit veraendertem Salzgehalt	22 - 34
3.2.3	Ergebnisse der Versuche mit veraendelter Temperatur	34 - 41
3.2.4	Ergebnisse der Versuche mit veraendertem pH-Wert und Auswertung der Fluorescamin-Ergebnisse	41 - 47
3.2.5	Ergebnisse der fluoreszenzmikroskopischen Auswertung der Proben mit insitu-Salzgehalt und experimentell veraendertem Salzgehalt	47 - 49
4.0	Diskussion	49 - 52
5.0	Zusammenfassung	52 - 53
6.0	Danksagung	53 - 54
7.0	Literatur	54 - 56

1.0 : EINLEITUNG:

Marine Bakterien benutzen fuer Stoffumsatzprozesse ein komplexes Enzymsystem, dessen einzelne Bestandteile sich sowohl in den Bakterienzellen als auch aussen auf den Bakterienzellen befinden (BURNS, 1980, KIM & ZOBELL, 1974). Diese ausserhalb der Bakterienmembran befindlichen bakteriogenen Enzyme werden in ihrer Gesamtheit als extrazellulaere Enzyme bezeichnet. Mit Hilfe dieser extrazellulaeren Enzyme koennen die Bakterien die bei der Lyse toter Organismen anfallenden komplexen organischen Verbindungen hydrolytisch spalten. Die so entstandenen kleineren Molekuele koennen dann von den Bakterien aufgenommen werden. Dies gilt ebenso fuer die aus Exudationsprozessen des Phytoplanktons hervorgehenden organischen Substanzen, sofern sie makromolekularer Natur sind. (KIM, 1985 und KIM & HOPPE, 1985)

Die extrazellulären Enzyme koennen sich auch von der Zellmatrix abloesen oder abgelooest werden; sie gehen dann als frei geloeste Enzyme in die Wasserphase ueber und koennen dann z.B. an Partikel adsorbiert werden. Vermutlich aus energetischen Gruenden kommt dieses aber meist nur in geringen Masse vor. In jedem Fall spielen die extrazellulaeren Enzyme aber eine wesentliche Rolle bei der Umsetzung partikulaerer Substanzen in marinen Oekosystemen (KIM & ZOBELL, 1974).

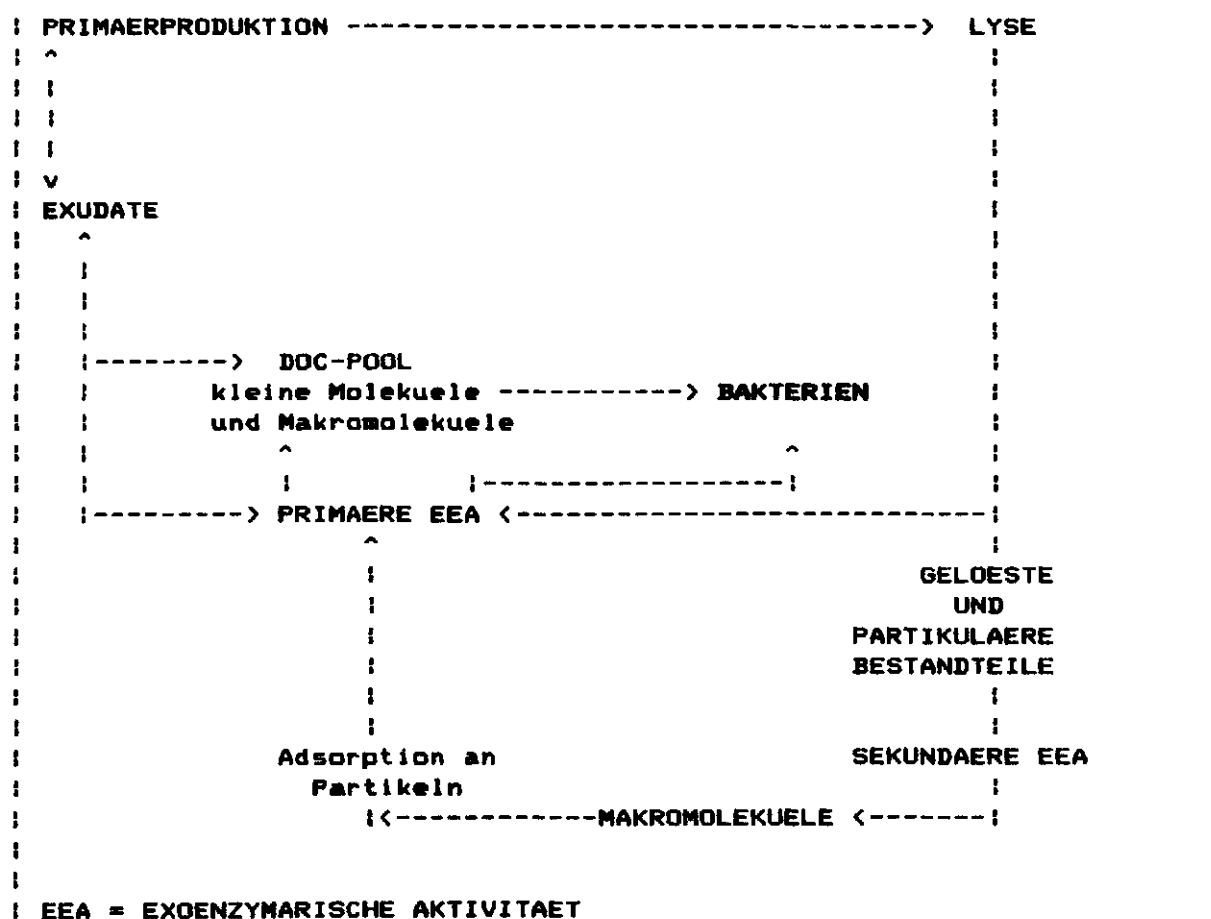


Abb. 1: Kreislauf der von den planktischen Primärproduzenten freigesetzten Nährstoffe und ihr Beitrag zum Makromolekuelpool marin-pelagischer Lebensgemeinschaften;
nach HOPPE, H.G., 1983 (unveröffentlicht).

Der weitaus groessere Teil der freien extrazellulaeren Enzyme liegt locker an partikulaere Substanzen gebunden vor bzw. befindet sich auf der Membran der Mikroorganismen (POLLOCK, 1962). Diese Enzyme haben genau wie die frei im Wasser vorkommenden Enzyme eine sehr hohe Substrat-Affinitaet zu den zu verarbeitenden organischen Substanzen. Ein grobes Schema zeigt Abb. 1.; (HOPPE, H.G. 1983; unveroeffentlicht).

Die marinen und Brackwasserbakterien und deren extrazellulaeren Enzyme sind an die herrschenden in-situ-Bedingungen (Salzgehalt; pH-Wert; Temperatur etc.) ihrer Umwelt angepasst. Aendert man einen wichtigen Umweltparameter, wie z.B. den Salzgehalt, sehr schnell, so fuehrt dies unter den gegebenen Laborbedingungen zu einer Aenderung der Umsatzrate. Ein Beispiel hierfuer ist in Tab. 10 dargestellt.

Ziel dieser Arbeit war, diese Umsatzraten in Abhaengigkeit von der Aenderung der Umweltparameter zu verfolgen, wobei der Einfluss des Salzgehaltes im Vordergrund stand.

Als 1. Arbeitshypothese wurde angenommen, dass eine annaehernde Linarietaet der HANES-Plots ($[S]/V_2 \backslash [S]$) nach der MICHAELIS-MENTEN-KINETIK vorliegt. Da dies aber nur bei experimenteller Temperaturerhoehung der Fall ist, bei allen anderen Faellen aber von einer Nichtlinarietaet ausgegangen werden muss, wurde in einer 2. Arbeitshypothese der Einfluss von veraenderten Umweltbedingungen auf die Artendiversitaet und das damit verbundene eingeengte Spektrum vorhandener Enzyme angenommen und diskutiert.

2.0 : MATERIAL UND METHODEN:

Da die Spaltung der Makromoleküle im natürlichen Medium nicht direkt gemessen werden kann, verwendet man zur Messung der Aktivität der vorhandenen extrazellulären Enzyme leicht nachweisbare Modell-Substrate, die nach erfolgter enzymatischer Spaltung ein leicht und eindeutig zu identifizierendes Mess-Signal liefern. Hierfür eignen sich Fluoreszenz-Tracer wegen ihrer relativ einfachen und ungefährlichen Handhabung im Versuchsablauf ebenso wie radioaktiv markierte Substrate, die jedoch bedingt durch ihre Handhabung eines größeren Laboraufwands bedürfen. Ausserdem kann mit fluorochromierten Substanzen der gesamte hydrolytische Abbau einer Verbindung gemessen werden, während mit Radiotracern nur der in Organismen inkorporierte Teil der Hydrolyseprodukte gemessen wird. Zur Bestimmung des nicht aufgenommenen Teils ist dann eine säulenchromatographische Trennung erforderlich, die mit Radiotracern durchgeführt, einen erheblichen Aufwand erfordert.

(Hollibaugh & Azam, 1983)

In den nachfolgend beschriebenen Versuchen wurden MUF-(Methyl-Umbelliferyl-)gekoppelte Substratanaloge für die im Versuchsmedium vorkommenden makromolekularen organischen Substrate verwendet. Diese MUF-Substrat-Analogen (MUF-Leucin, MUF-Phosphat, MUF- α -D-Glucosid und MUF-N-acetyl-Glucosaminid) wurden dem Versuchsmedium in verschiedenen hohen Konzentrationen zugesetzt, so dass bei der höchsten Konzentration die natürliche Substratkonzentration gegenüber dem zugesetzten Substrat vernachlässigbar klein sein sollte.

Der bei der hydrolytischen Umsetzung freiwerdende Fluoreszenz-Tracer wird als quantitatives Mass für die extrazelluläre Aktivität betrachtet und mit Hilfe eines Fluorimeters (JASCO FP 550) bei 365 nm (Immission) und 445 nm (Emission) gemessen.

Die bei den angesetzten Konzentrationsreihen (Zugabe von 0.5 bis 80 μ mol MUF-Substrat) aufgetretenen Emissionsänderungen wurden in Abhängigkeit von der Zeit aufgezeichnet (relat. Fluoreszenz\Zeit-Plot). Die Inkubationszeit betrug durchgehend ca. 6 Stunden. Die Messintervalle lagen bei ca. 90 Minuten. Den genauen Versuchsablauf gibt Abb. 2 wieder.

Zu Beginn der Versuchsreihe wurden durch Vorversuche die einzelnen Modellsubstrate getestet, um das geeignetste Substrat zu ermitteln, das dann bei den weiterführenden Versuchen verwendet werden sollte. Um eine Grundlage für die Vergleichbarkeit der Versuchswerte bei veränderten Parametern zu finden, war es nötig, ein Modellsubstrat einzusetzen, auf das die Enzyme der Bakterienpopulation über den gesamten Konzentrationsbereich mit einer eindeutigen Konzentrationsabhängigkeit in den jeweiligen Umsatzraten reagieren.

Die Planung des gesamten Versuchsprogramms stellt sich folgendermassen dar:

Pro Versuchstag wurden zwei 2L-Proben in ca. 1 m Wassertiefe an der Pier des Instituts für Meereskunde in Kiel aus der Kieler Förde entnommen. Die gesamte Probe (4L) wurde in 2 Unterproben unterteilt, eine insitu-Probe und eine Probe, bei der ein Parameter verändert wurde (z.B.: schnelle Salzgehaltserhöhung auf $S = 30 \cdot 10^{-3}$). Anschliessend wurden beide Proben mit je einem der o.g. Modellsubstrate versetzt; (0.5 bis 80 μ mol bei 100 ml Probenvolumen).

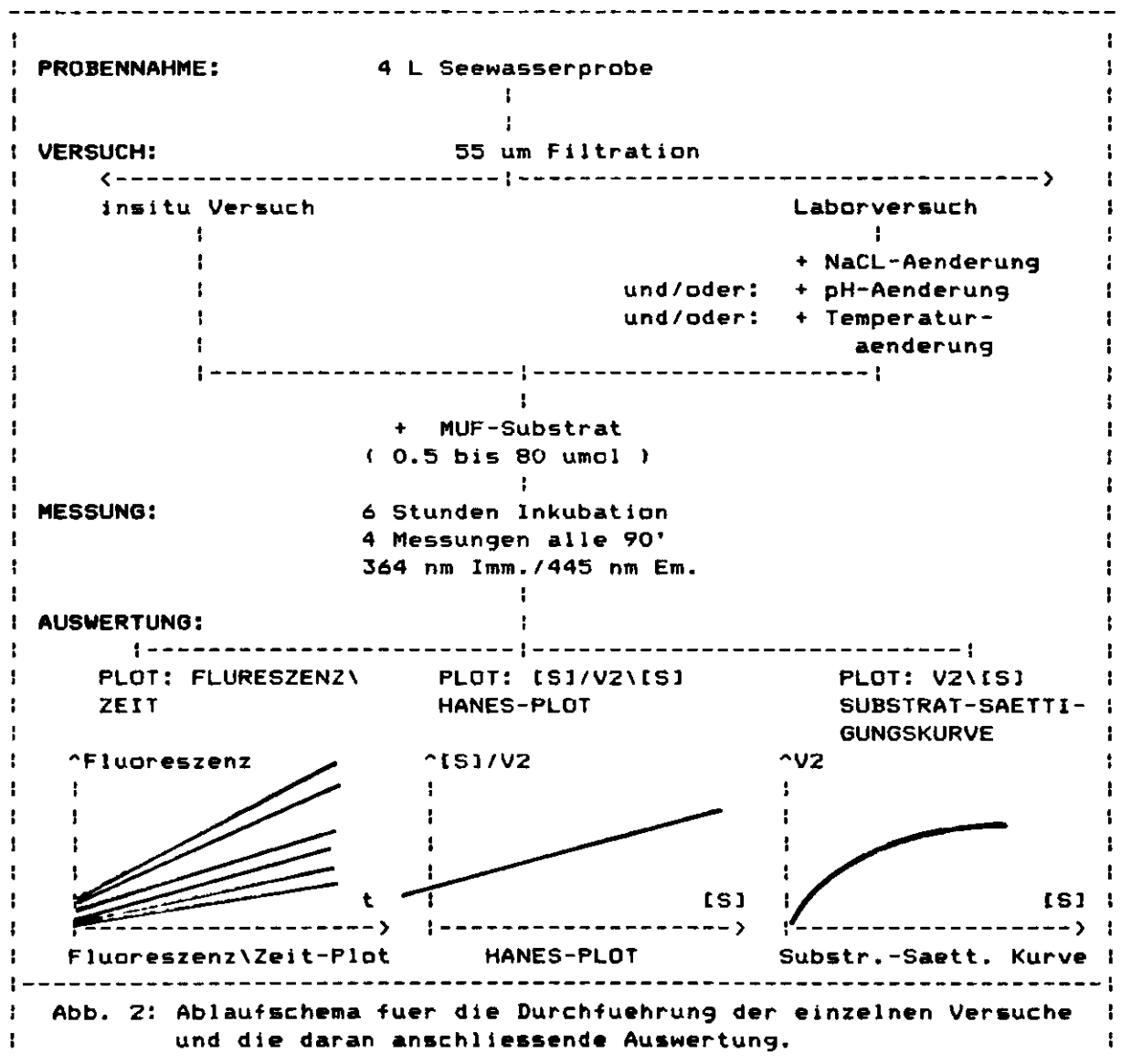
Folglich waren pro Messtag 4 Probenserien zu verarbeiten:

- 1.: Insitu-Probe + MUF-Substrat I
- 2.: Insitu-Probe + MUF-Substrat II

- 3.: Veraenderte Probe + MUF-Substrat I
- 4.: Veraenderte Probe + MUF-Substrat II

Alle Messergebnisse wurden gemaess den Schemata in Abb. 2 graphisch dargestellt.

Zur Absicherung der Ergebnisse der Hauptversuche war es notwendig, nicht nur die Einwirkung von schnellen und langsamen Salzgehaltsaenderungen auf die insitu-Population, sondern auch auf die Auswirkungen von Temperaturveraenderungen (z.B.: Insitu-Temperatur + 10 Grad Celsius; RGT-Regel) und pH-Wert-Aenderungen (insit-pH +/- 2) zu betrachten. Ausserdem wurden Untersuchungen mit Fluorescamin zum Nachweis freier geloester primaerer Aminosaeuren vorgenommen, um bei schneller Salzgehaltserhoehung die bezueglich der Umsatzkinetik auftretenden Veraenderungen erklaren zu koennen.

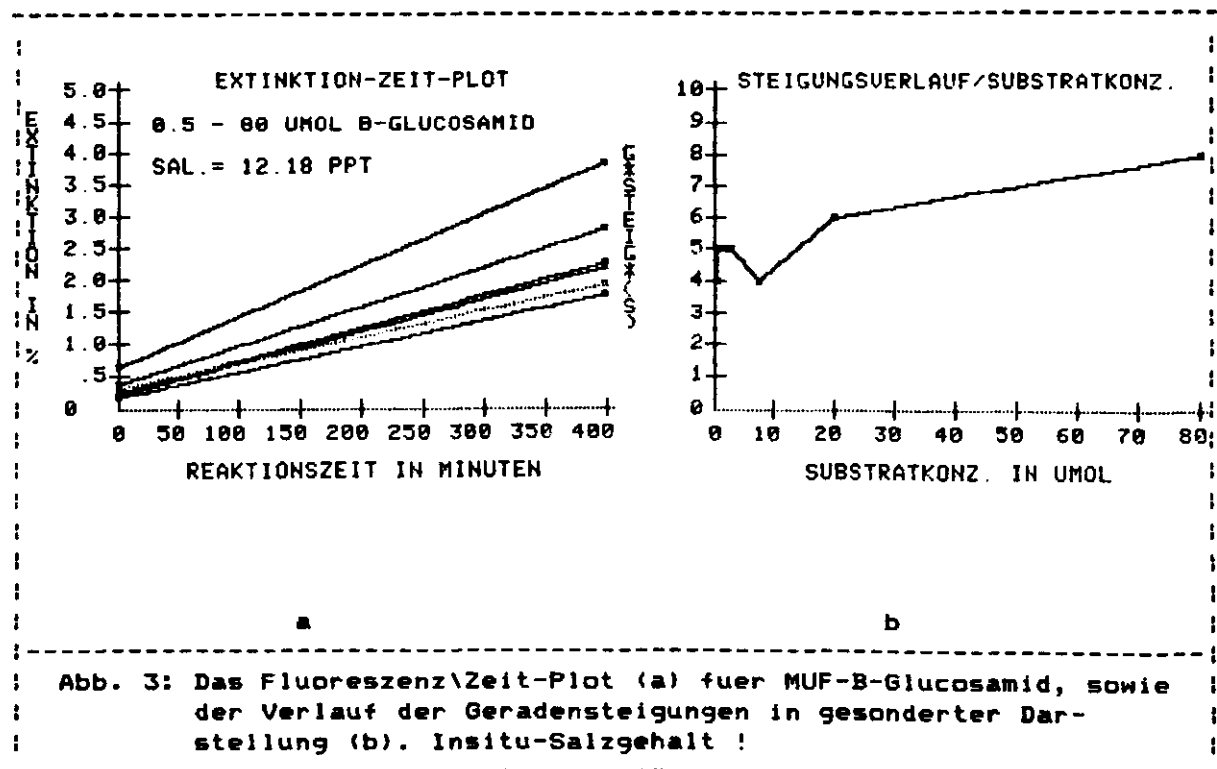


3.0 : ERGEBNISSE:

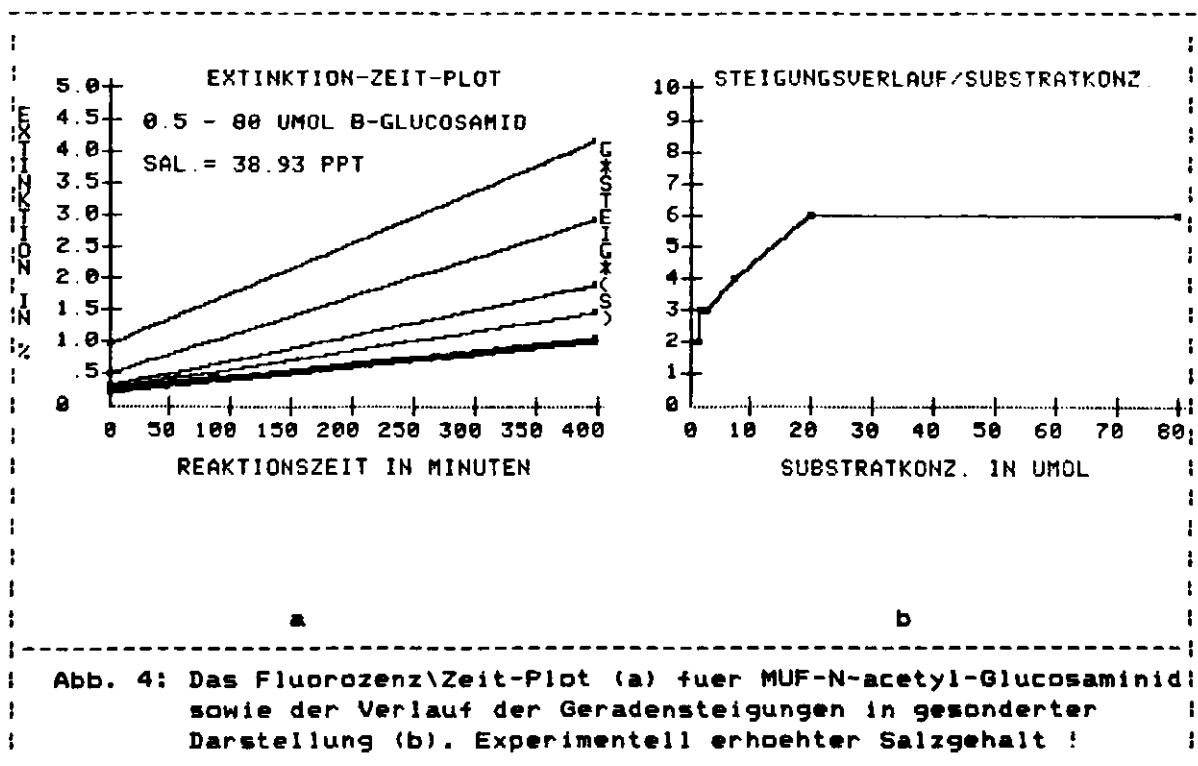
3.1 : ERGEBNISSE DER VORVERSUCHE:

Die Vorversuche ergaben, dass die untersuchten pelagischen Mikroorganismen-Populationen gegenueber den verschiedenen zugesetzten MUF-Substraten ein unterschiedliches Umsatzverhalten zeigen.

Bei der Verwendung von MUF-N-acetyl-Glucosaminid zeigte sich bei der insitu-Probe ein scheinbar nicht von der Substratkonzentration abhaengiges Umsatzverhalten (Abb. 3).



Die Ursache hierfuer koennte in der grossen Arten-Variabilitaet der insitu-Population gesehen werden. Dies wuerde bedeuten, dass die in der insitu-Population vorkommenden Arten extrazellulaere Enzyme mit unterschiedlicher Affinitaet zu MUF-N-acetyl-Glucosaminid besitzen. Dies scheint sich zu bestaetigen, wenn man die pelagischen Mikroorganismen der insitu-Probe einem extremen osmotischen Stress durch z.B. schnelle Salzgehaltserhoehung auf $39 \cdot 10^{-3}$ aussetzt. Diesen osmotischen Stress koennen nur wenige Mikroorganismen ertragen; folglich befinden sich dann in der Probe nur noch wenige aktive, extrem halotolerante Mikroorganismen mit aehnlichem Verhalten gegenueber dem Modellsubstrat. Als Resultat ist im Gegensatz zur insitu-Probe eine deutliche Konzentrationsabhaengigkeit in den jeweiligen Umsatzraten zu erkennen (Abb. 4).



Bei der Verwendung von MUF- α -D-Glucosid als Modellsubstrat zeigte sich bei der insitu-Probe (Sal. = $13.2 \cdot 10^{-3}$) ebenso wie bei MUF-N-acetyl-Glucosaminid keine eindeutige Konzentrationsabhaengigkeit der Umsetzung der zugefuegten Substrate. Die ermittelten Geraden des Fluoreszenz\Zeit-Plots lagen fuer die Konzentrationen zwischen 0.5 und 80 μmol sehr dicht zusammen und waren nicht, wie zu erwarten waere, der Substratkonzentration entsprechend "gestaffelt", sondern waren auch untereinander vertauscht. Lediglich die Werte fuer 20 und fuer 80 μmol setzten sich deutlicher ab. Es konnte jedoch keine signifikante lineare Beziehung zwischen Incubationszeit und umgesetztem Substrat festgestellt werden (Abb. 5).

Fuer die Probe mit experimentell stark erhoehetem Salzgehalt (Sal. = $31 \cdot 10^{-3}$) zeigt sich ein aehnliches Bild wie bei der insitu-Probe. Hier koennte eine weiterfuehrende Interpretation der Ergebnisse zu falschen Schluessen fuehren (Abb. 6).

Die Verwendung von MUF-Phosphat ergab zwar ueber den untersuchten Konzentrationsbereich ein gleichfoermiges Bild der Substratumsetzung, doch traten sowohl bei der insitu-Probe (Abb. 7), als auch bei der Probe mit stark erhoehetem Salzgehalt (Sal. ca $40 \cdot 10^{-3}$) (Abb. 8) Schnittpunkte der Geraden in den unteren Konzentrationsbereichen auf, die eine weiterfuehrende Interpretation des Datenmaterials erschweren.

Bei Verwendung von MUF-Leucin als Modellsubstrat ergaben sich die deutlichsten Konzentrationsabhaengigkeiten fuer die Umsetzung des zugegebenen Substrates. Es konnte sowohl fuer die insitu-Probe (Sal. = $13.2 \cdot 10^{-3}$) als auch fuer die Probe mit stark erhoehetem Salzgehalt (Sal. = $31 \cdot 10^{-3}$) gezeigt werden, dass die ermittelten Geraden in einem direkten Zusammenhang mit der zugegebenen Menge an Modellsubstrat stehen. (Abb. 9 und Abb. 10).

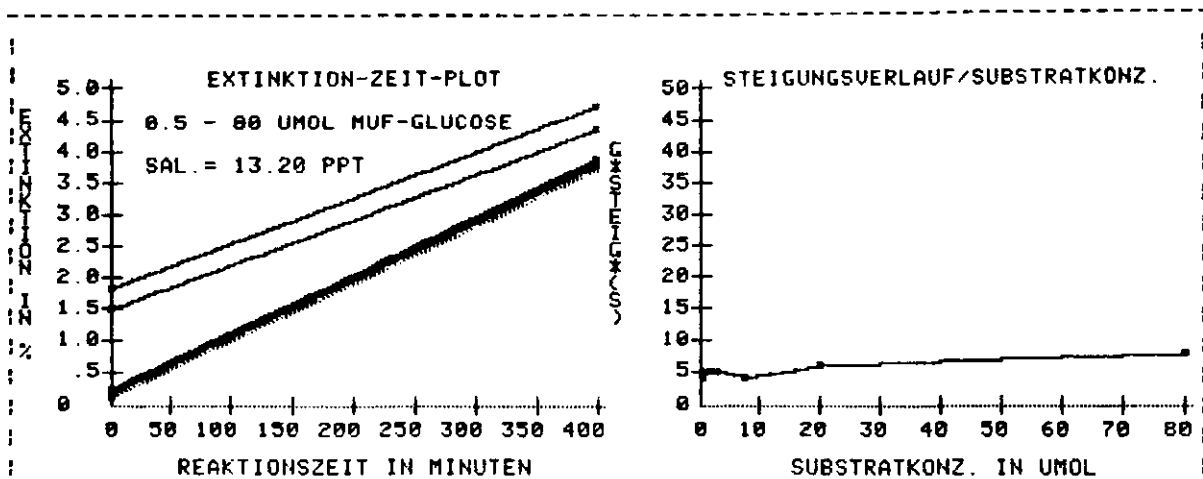


Abb. 5: Das Fluoreszenz\Zeit-Plot (a) fuer MUF-a-D-Glucosid, sowie der Verlauf der Geradensteigungen in gesonderter Darstellung (b). Insitu-Salzgehalt !

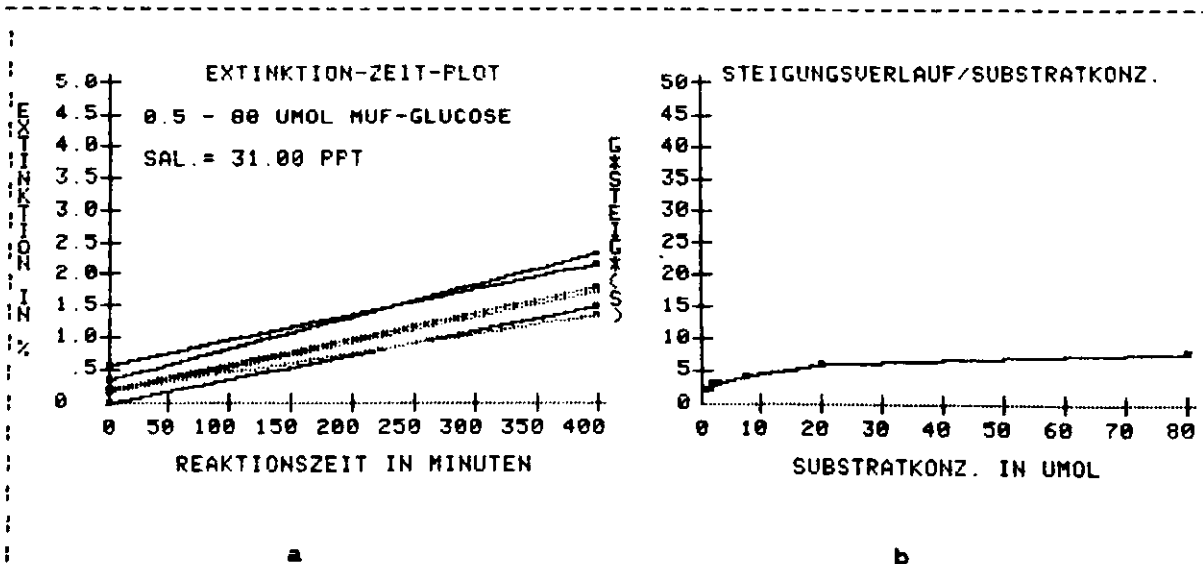


Abb. 6: Das Fluoreszenz\Zeit-Plot (a) fuer MUF-a-D-Glucosid, sowie der Verlauf der Geradensteigung in gesonderter Darstellung (b). Experimentell erhoehter Salzgehalt !

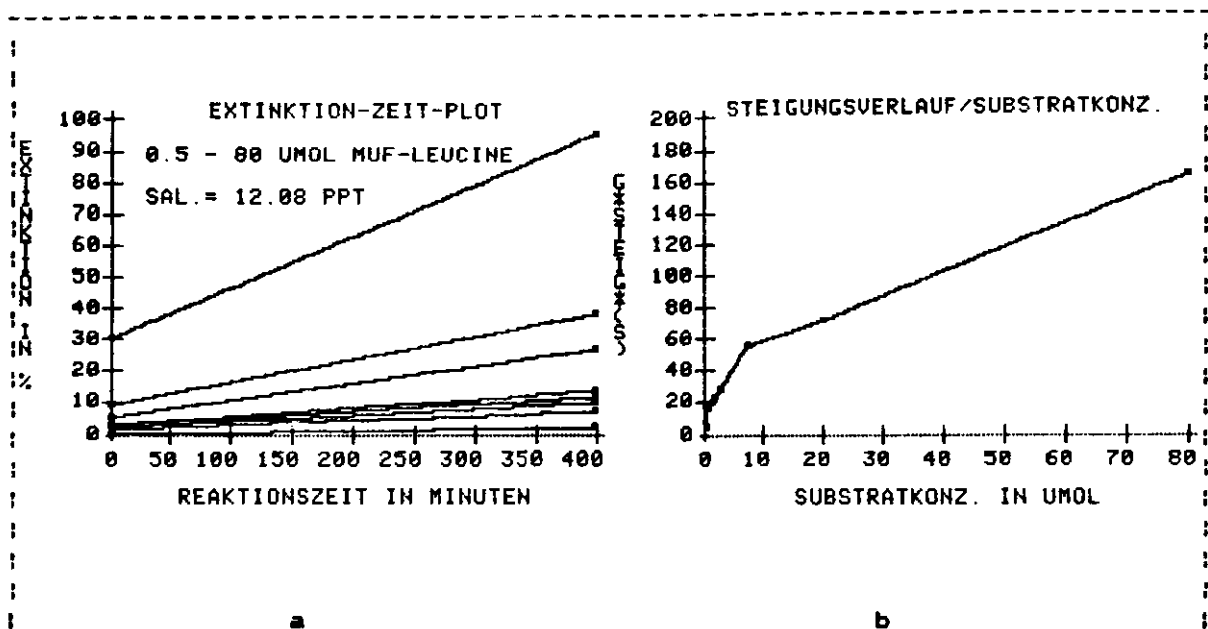


Abb. 9: Das Fluoreszenz\ZeitPlot (a) fuer MUF-Leucin, sowie der Verlauf der Geradensteigung in gesonderter Darstellung (b). Insitu-Salzgehalt !

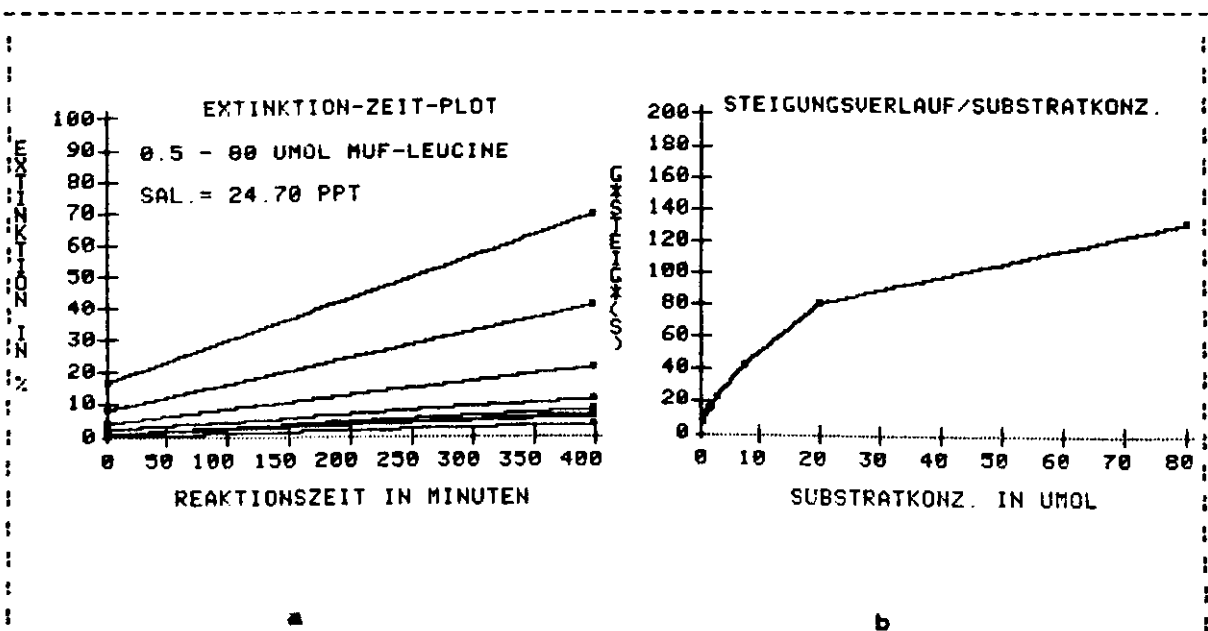


Abb.10: Das Fluoreszenz\Zeit-Plot (a) fuer MUF-Leucin, sowie der Verlauf der Geradensteigung in gesonderter Darstellung (b). Experimentell erhoehter Salzgehalt !

Da die Verwendung von MUF-Leucin als Modellsubstrat die Zusammenhaenge zwischen Umsatzaktivitaet und Konzentration der zugegebenen Substanz am deutlichsten widerspiegelt, wurde in den folgenden Versuchen ausschliesslich MUF-Leucin verwendet.

Zusammenfassend laesst sich ueber die Ergebnisse der Vorversuche folgendes sagen:

1) Waehrend der gesamten Inkubationszeit von ca. 6 Stunden verlief die Zunahme der Fluoreszenz pro Zeiteinheit bei allen Proben fuer alle Substrate und Konzentrationen stets streng linear, d.h. Aktivitaet und Menge der jeweils in der Probe enthaltenen extrazellulaeren Enzyme blieb waehrend der Inkubationszeit konstant und wurde nicht durch eventuell denkbare Adaptions- und Wachstumsvorgaenge der Bakterien veraendert.

2) Die Erhoehung des Salzgehaltes fuehrte vermutlich ueber die drastische Einengung des Artenspektrums der Bakterien und damit der Enzymvielfalt, in den meisten Faellen zu einer besseren Erfuellung der Enzymkinetik 1.Ordnung.

3) In den Faellen, wo keine deutlichen differenzierbaren Aenderungen der Enzymaktivitaet mit steigender Substratzugabe erfolgten, waere zu ueberlegen, ob der gewaehlte Bereich der Konzentrationen fuer eine Substratzugabe geaendert werden muss; dies betrifft besonders die Verhaeltnisse bei dem Substrat MUF-a-D-Glucosid.

3.2 : ERGEBNISSE DER HAUPTVERSUCHE:

3.2.1 : Ergebnisse der Versuche bei insitu Salzgehalten:

Insgesamt wurden im Zeitraum vom 16.06. bis 27.06.1983 5 Wasserproben mit insitu Salzgehalten zwischen 11.45 und $13.53 \cdot 10^{-3}$ im Hinblick auf die Umsatzkinetik von MUF-Leucin untersucht. Diese Substanz gilt als Modellsubstanz fuer Verbindungen, die eine oder mehrere Peptidbindungen aufweisen. Die natuerliche Salzgehaltsschwankung betrug waehrend des Messzeitraums $2.08 \cdot 10^{-3}$ bei einem Mittelwert von $12.72 \cdot 10^{-3}$; in Abb. 11 sind die an den jeweiligen Messtagen vorliegenden Salzgehalte dargestellt.

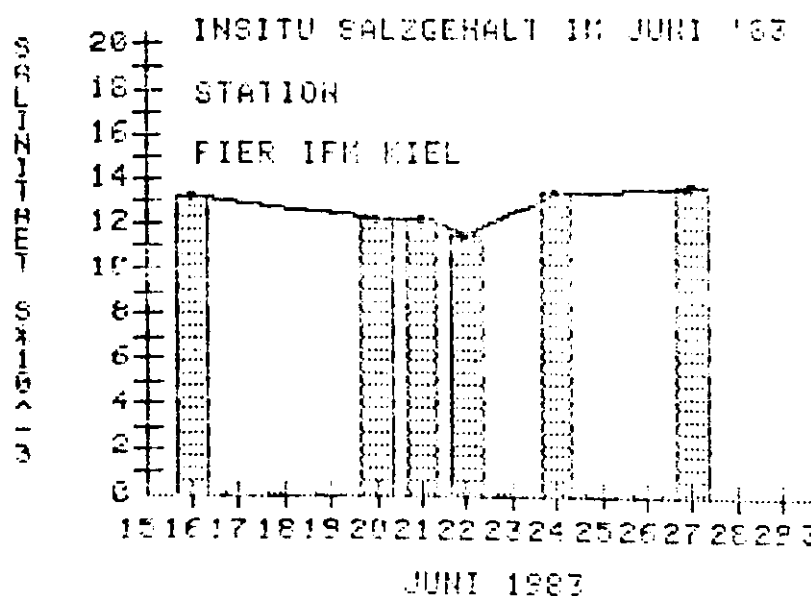


Abb. 11: Insitu Salzgehalte an der Pier des Instituts fuer Meereskunde der Universitaet Kiel, gemessen im Zeitraum vom 16.06 bis 27.06. 1983.

I SALZGEH.	I KONZENTRATION [umol MUF-Leucin]	I STATIST. DATEN	I
I INSITU	I 0.5 1.0 1.5 2.0 3.0 7.5 20.0 80.0	I P = 95 % VB	I
I (*10 ⁻³)	I Regressionsgeraden-Steigung [umol/min]	I MITTELWERT\SD	I
I	I	I	I
I 11.45	I .013 .022 .030 .036 .043 .078 .116 .241	I 0.0724 0.076	I
I 12.08	I .005 .016 .020 .023 .028 .056 .072 .164	I 0.0480 0.052	I
I 13.20	I .010 .013 .018 .021 .029 .049 .088 .226	I 0.0568 0.073	I
I 13.34	I .010 .015 .017 .020 .026 .041 .073 .142	I 0.0430 0.045	I
I 13.54	I .022 .028 .034 .037 .041 .060 .101 .154	I 0.0596 0.046	I
I	I	I	I
I 12.72	I .012 .019 .024 .027 .033 .057 .090 .185	I MITTELWERTE	I
I .9096	I 6.28 6.14 7.69 8.38 7.96 13.9 18.8 44.9	I SD * 10 ³	I
I	I	I	I
I F-TEST	I 1.05 1.57 1.18 1.11 3.04 1.83 5.71	I F krit.= 6.390	I
I t-TEST	I 1.73 1.14 0.71 1.16 3.27 3.18 4.38	I t-krit.= 2.306	I
I	I	I	I
I Tab. 1 :	I Steigungen der Regressionsgeraden im Fluoreszenz\Zeit-Plot	I	I
I	I in Abhaengigkeit vom insitu Salzgehalt; MUF-Leucin;	I	I

Wie bei den Vorversuchen beschrieben, wurden den Wasserproben MUF-LEUCIN in verschiedenen Konzentrationen zugesetzt und die durch die enzymatische Spaltung dieser Substanz hervorgerufene Fluoreszenz nach bestimmten Zeiten gemessen. Auf die Angabe der resultierenden Einzelwerte in tabellierter Form wird hier verzichtet, weil es in dieser Arbeit vor allem um die Art und Gueltigkeit der Transformationsmoeglichkeiten geht.

Bei der Auswertung der Fluoreszenz/Zeit-Plots zeigt sich eine deutliche Zunahme der Steigungen der den jeweiligen MUF-Leucin Substrat-Konzentrationen entsprechenden Regressionsgeraden. Die gemessenen Geradensteigungen sind in Tab. 1 dargestellt; Abb. 12 zeigt die Schwankungen der Regressionsgeraden-Steigungen in Abhaengigkeit vom vorliegenden insitu-Salzgehalt.

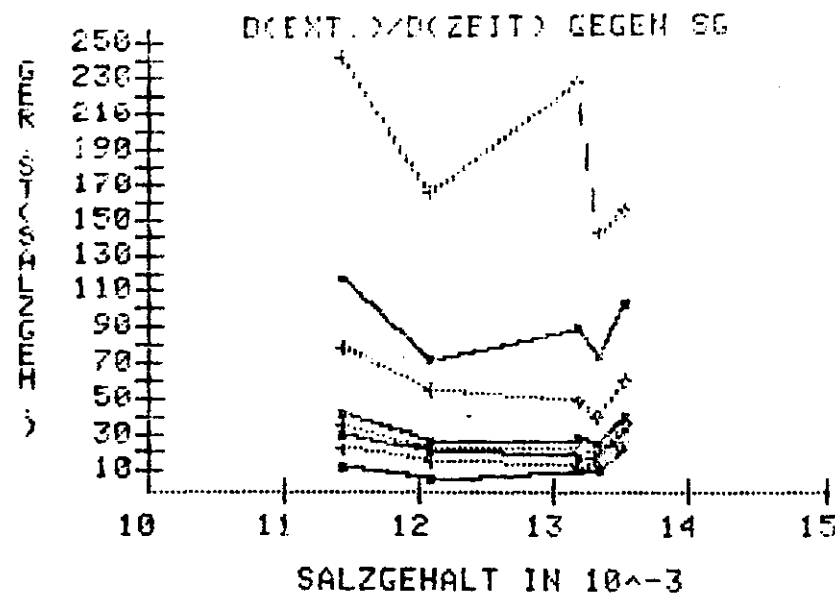


Abb. 12: Schwankungen der Regressionsgeraden-Steigungen im Fluoreszenz/Zeit-Plot in Abhängigkeit vom insitu Salzgehalt. (MUF-Leucin)

Die Durchführung einfacher statistischer Tests (F- und t-Test) zeigt jedoch, dass die Unabhängigkeit der Mittelwerte erst zwischen 3.0 und 7.5 μmol nachzuweisen ist.

Berechnet man aus den vorliegenden Daten die Substrat-Sättigungskurven ($V_2/[S]$) (Abb. 13 und 19 - 23; Tab. 2), so zeigen diese nicht das zu erwartende Kurvenbild. Die Durchführung der nichtlinearen Regression mit Hilfe eines "Optigress-Programmes" (TATZL, 1982) das aus 4 Regressionsmodellen (linear; exponentiell; logarithmisch; potentiell) jeweils das Modell mit dem höchsten Korrelationskoeffizienten auswählt, zeigte, dass in allen Fällen eine potentielle Regression mit $r > 0.95$ vorliegt, während die Korrelationskoeffizienten für exponentielle und logarithmische Regression jeweils unter $r \leq 0.95$ lagen (Tab. 2).

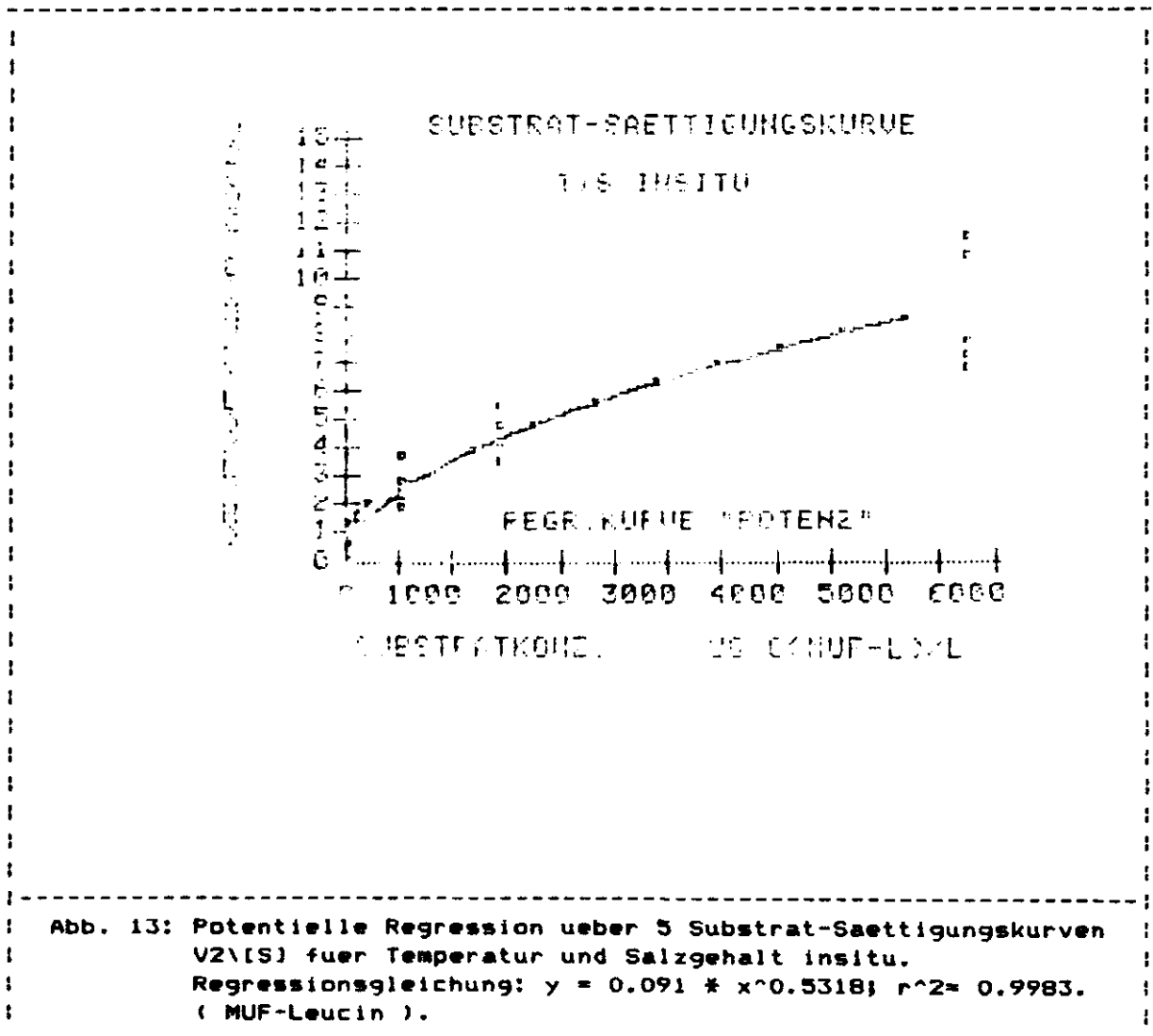
Dies zeigt also, dass fuer die vorliegenden Daten keine Saettigungskurve mit einem definierten Grenzwert vorliegt; das Datenmaterial laesst eher auf das Nichterreichen einer Substratsaettigung schliessen. Aus frueheren Versuchen ist aber bekannt, dass eine Substrat-Saettigung erst bei sehr hohen Konzentrationen vorzuliegen scheint; (ca 1,0 Mol !!; KIM, 1985). Die folgenden statistischen Untersuchungen koennen daher als Auswertungsmoeglichkeiten und/oder Vorschlaege angesehen werden, die zur Anwendung kommen koennen, wenn eine moegliche Substratsaettigung wegen sehr hoher Substratzugaben, die z.B. unerwuenschte Wachstumsreaktionen oder Endprodukthemmung hervorrufen, nicht erreicht werden.

I [S]	I	SALZGEHALT [*10 ⁻³]					I MITTEL-	I SD	I
I [UG C/L]	I	13.20	12.08	11.45	13.34	13.54	I WERT	I#10 ⁻³	I
I-----I	I-----I	-----I-----I-----I					I-----I	I-----I	I
I 36	I	0.4752	0.2376	0.6192	0.4770	1.0494	I 0.5717	I 300.2	I
I 72	I	0.6192	0.7632	1.0512	0.7150	1.3356	I 0.8968	I 293.4	I
I 108	I	0.8568	0.9504	1.4328	0.8110	1.6218	I 1.1346	I 368.1	I
I 144	I	1.0008	1.0944	1.7136	0.9540	1.7649	I 1.3055	I 399.6	I
I 216	I	1.3824	1.3320	2.0520	1.1920	1.9557	I 1.5828	I 392.1	I
I 540	I	2.3400	2.6712	3.7224	1.9560	2.8619	I 2.7103	I 662.4	I
I 1440	I	4.1976	3.4344	5.5296	3.4820	4.8176	I 4.2922	I 895.6	I
I 5760	I	10.7784	7.8192	11.4984	6.7730	7.3456	I 8.8429	I 2143.	I
I-----I	I-----I	-----I-----I-----I					I-----I	I-----I	I
ISTATISTIK I----- NICHTLINEARE REGRESSION -----I									
I REGR. MOD. I	I	r	r	r	r	r	I ^	I ^	I
I-----I	I-----I	-----I-----I-----I					I-----I	I-----I	I
I POT. REGR. I	I	0.9987	0.9693	0.9952	0.9993	0.9973	I 0.9920	I 12.77	I
I LOG. REGR. I	I	0.9103	0.9456	0.9490	0.9337	0.9665	I 0.9430	I 20.40	I
I EXP. REGR. I	I	0.8634	0.7632	0.8147	0.8493	0.8432	I 0.8268	I 39.71	I
I-----I	I-----I	-----I-----I-----I					I-----I	I-----I	I
I Tab. 2 :	VZ-Werte aus den Substrat-Saettigungskurven VZ\[S] fuer								I
I	MUF-Leucin in Abhaengigkeit von insitu Salzgehalten,								I
I	gemessen im Juni 1983 in der Kieler Foerde;								I
I	VZ= [ug C * L ⁻¹ * h ⁻¹].								I
I	Fuer die Gleichung des potentiellen Regressionsmodells								I
I	gilt: y= 0.091 *x ^{0.5318} ; r ² = 0.9983								I
I-----I	I-----I	-----I-----I-----I					I-----I	I-----I	I

Die Durchfuehrung des F-Tests bezueglich der gemittelten r-Werte ergibt F-Werte von 2.56, 3.77 und 9.67 fuer df1= df2= 4 bei einem kritischen F-Wert von 6.39 fuer P=95% und 16.0 fuer P=99%; dies bedeutet, dass das potentielle Regressionsmodell fuer die Substrat-Saettigungskurve im Vergleich zum exponentiellen und logarithmischen Regressionsmodell signifikant verschiedene und damit bessere Daten liefert. Fuehrt man fuer das potentielle und das logarithmische Modell den t-Test fuer unabhaengige Mittelwerte durch, so errechnet sich ein t von 4.55 bei df=8 bei einem kritischen t-Wert von 3.36 fuer P= 1% bzw. 5.04 fuer P= 0.1%; somit gilt die Verschiedenheit auch fuer den Vergleich der potentiellen mit der logarithmischen Regression.

Berechnet man fuer die vorliegenden Daten das HANES-PLOT, ergeben sich die in Tab. 3 dargestellten Regressionsdaten (Tab. 3). Die HANES-PLOTS zu den jeweiligen Salzgehalten sind in den Abb. 14, 15 und 16 dargestellt.

Da dieses enzymkinetische Modell auf der MICHAELIS- MENTEN-KINETIK basiert (MICHAELIS & MENTEN, 1913, PFAENDER, 1982, KRAMBECK, 1979 u. a.), ist die lineare Regression die dem Modell entsprechende Kurvenanpassung fuer die Daten $(([S]/V_2) \backslash [S])$. Berechnet man den Punkt $y = 0$ auf der Ausgleichsgerade, so erhaelt man dadurch die sogenannte MICHAELIS-MENTEN-KONSTANTE (K_m).



I [S]	I SALZGEHALT [#10^-3]	I MITTEL-	I STANDARD-	I
I [UG C/L]	I 13.20 12.08 11.45 13.34 13.54	I WERT	I ABWEICHUNG	I
I 36	I 75.47 150.95 58.06 75.47 34.31	I 78.852	I 43.70	I
I 72	I 106.11 94.34 68.61 100.63 53.91	I 84.720	I 22.43	I
I 108	I 125.79 113.21 75.47 133.19 66.59	I 102.850	I 30.08	I
I 144	I 143.76 131.26 83.86 150.94 81.59	I 118.282	I 33.22	I
I 216	I 156.15 161.73 105.31 174.17 101.45	I 139.762	I 33.87	I
I 540	I 231.04 202.16 145.14 276.12 188.68	I 202.628	I 48.81	I
I 1440	I 343.06 419.30 260.25 413.55 298.90	I 347.012	I 69.84	I
I 5760	I 534.33 736.33 501.07 850.41 784.14	I 681.256	I 155.15	I
I ISTATISTIK	I -----NICHTLINARE REGRESSION-----	I MITTEL-	I STANDARD-	I
I REGR. MOD.	I -----KORRELATIONSKOEFFIZIENT -----	I WERT	I ABWEICHUNG	I
I	I	I	I	I
I	I r r r r r	I	I	I
I LINEARE R.	I 0.9410 0.9681 0.9781 0.9770 0.9910	I 0.9712	I 0.0188	I
I POTENT. R.	I 0.9979 # 0.99 0.9923 0.9922 0.9992	I 0.9943	I 0.0040	I
I	I	I	I	I
I	I --- STEIGUNGEN + ACHSENABSCHNITT ---	I	I	I
I	I	I	I	I
I m(lin.R.)	I 0.0734 0.1091 0.0759 0.1280 0.1270	I 0.103	I 0.0267	I
I m(pot.R.)	I 0.3822 0.4717 0.4398 0.4140 0.6080	I 0.463	I 0.0874	I
I	I	I	I	I
I b(lin.R.)	I 139.37 137.68 83.62 138.28 69.38	I 113.666	I 34.3050	I
I b(pot.R.)	I 20.50 12.36 10.24 18.49 3.93	I 13.104	I 6.6451	I
I	I	I	I	I
I Tab. 3:	[S]/V2-Werte aus dem HANES-PLOT (([S]/V2)\[S]) fuer			
I	MUF-Leucin in Abhaengigkeit vom insitu-Salzgehalt,			
I	gemessen in der Kieler Foerde im Juni 1983;			
I	[S]/V2 = [ug C/L/h]. (#= ohne den Wert fuer 36 ug C/L/h)			
I	Fuer das lineare Regressionsmodell gilt: y= mx + b;			
I	Fuer das potentielle Regressionsmodell gilt: y= mx^b			

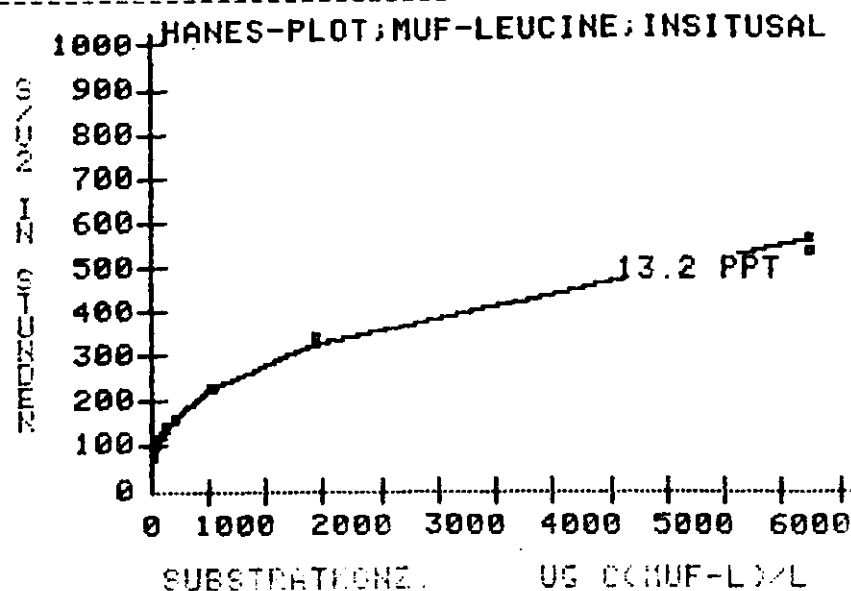


Abb. 14: HANES-PLOT fuer den insitu-Salzgehalt von $13.2 \cdot 10^{-3}$; in diesem Plot wurde keine lineare Ausgleichsfunktion, sondern eine potentielle Kurve berechnet.

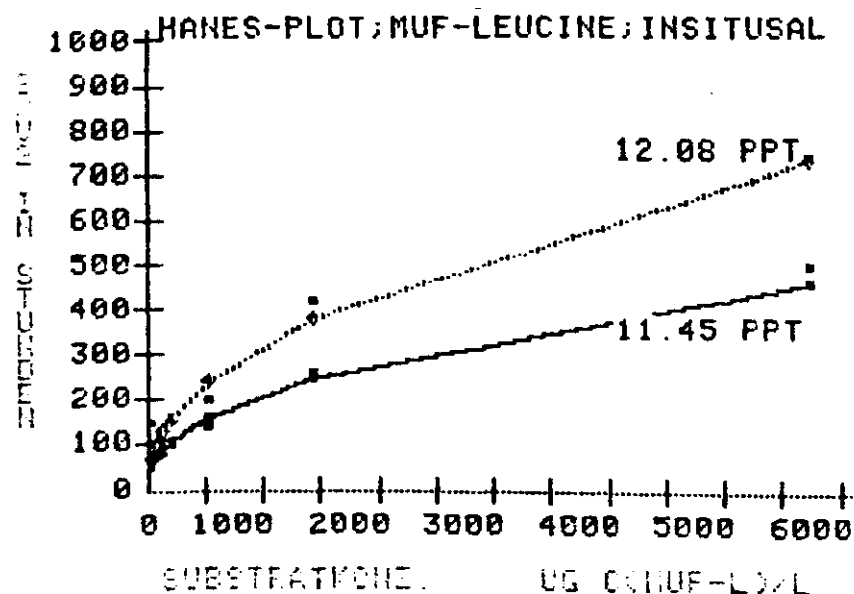
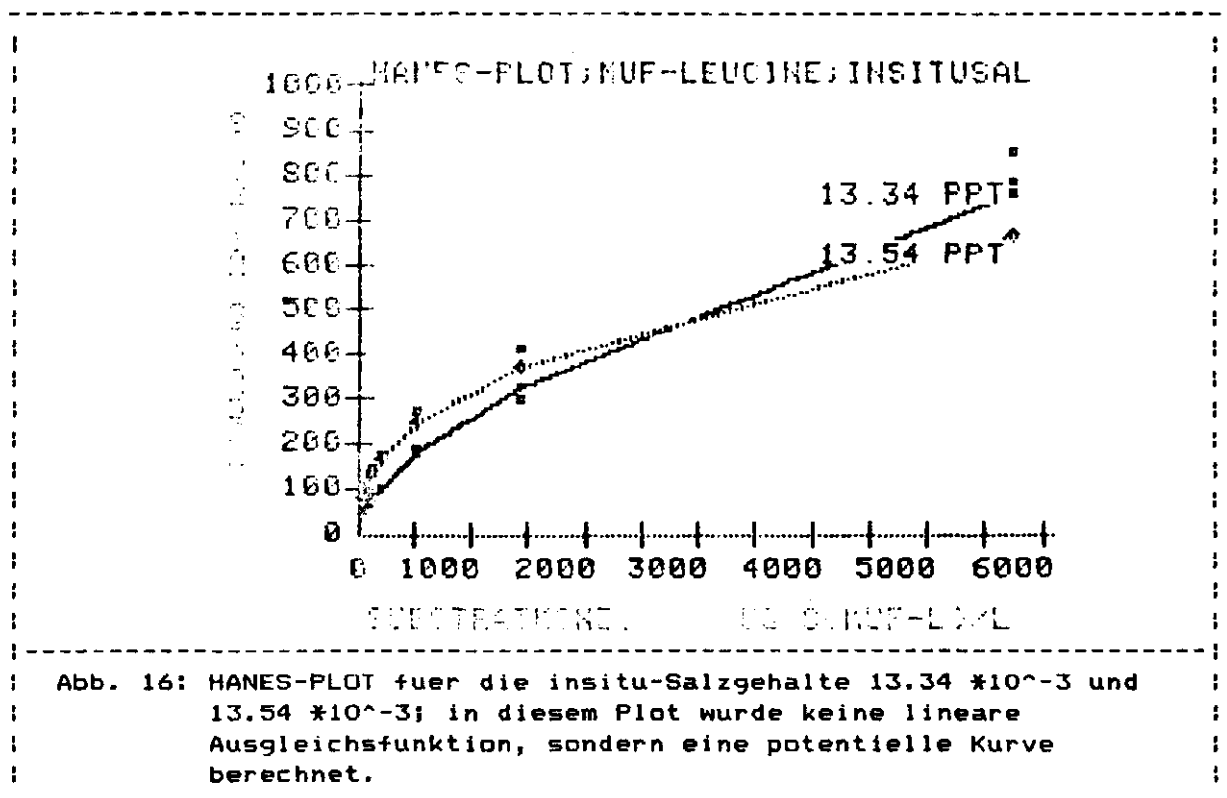
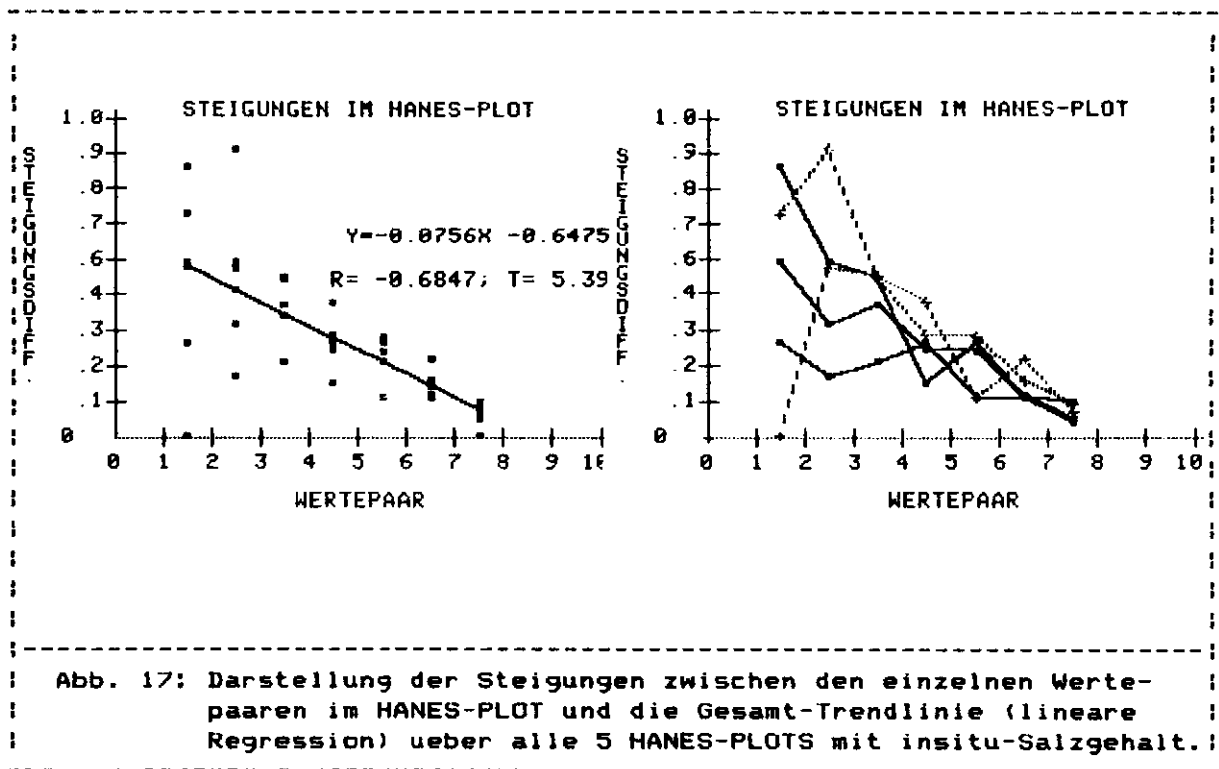


Abb. 15: HANES-PLOT fuer die insitu-Salzgehalte $12.08 \cdot 10^{-3}$ und $11.45 \cdot 10^{-3}$; in diesem Plot wurde keine lineare Ausgleichsfunktion, sondern eine potentielle Kurve berechnet.



Wie aus Tab. 3 und den Abb. 14, 15 und 16 ersichtlich ist, folgen diese Regressionskurven besser dem potentiellen als dem linearen Regressionsmodell. Dies ist bedingt durch eine durchwegs auftretende Abweichung der Daten fuer kleine Substratkonzentrationen von der Ausgleichsgerade. Die relativ hohen r -Werte fuer die lineare Regression sind darauf zurueckzufuehren, dass durch den Abstand der einzelnen Substratkonzentrationen untereinander eine unerwuenschte Gewichtung zugunsten der hoeheren Substratkonzentrationen auftritt. Um diesen Sachverhalt naeher zu untersuchen, soll der Verlauf der Steigungen innerhalb der jeweiligen HANES-PLOTS naeher betrachtet werden. Bildet man jeweils von einem Wertepaar zum naechsten die Differenz der Steigungen, so muesste gemuess dem MICHAELIS-MENTEN-MODELL bei der linearen Regression eine Parallele zur y -Achse als Ausgleichsgerade resultieren; ist dies aber nicht der Fall, sondern es ergibt sich eine Trendlinie mit einem signifikant von 0 verschiedenem Trend (Beweis mit Hilfe des t -Tests), so kann das MICHAELIS-MENTEN-MODELL fuer die vorliegenden Daten nicht ohne Fehler angewendet werden. Tab. 4 gibt die Steigungen von Substratkonzentration zu Substratkonzentration fuer jeweils einen Salzgehaltswert wieder, wobei die Daten von Tab. 3 die Berechnungsbasis bilden.



3.2.2 : Ergebnisse der Versuche mit erhöhtem Salzgehalt:

Insgesamt wurden 5 Wasserproben mit den unter 3.2.1 beschriebenen insitu-Salzgehalten zwischen 11.45 und $13.53 \cdot 10^{-3}$ verschieden hoch aufgesalzt. Ziel dieser Versuche war, die Auswirkungen dieses abrupt auftretenden osmotischen Stresses auf die extrazelluläre Enzymaktivität der pelagischen Mikroorganismen gegenüber MUF-Leucin zu erfassen. Hierzu wurden zur Absicherung der Ergebnisse 4 Proben schnell, d.h. sofort nach der Probenahme auf ihren jeweiligen Versuchssalzgehalt aufgesalzt, während eine Probe ($13.34 \cdot 10^{-3}$ insitu-Salzgehalt) in kleinen Schritten über die Dauer von 3 Stunden kontinuierlich auf ihren Versuchssalzgehalt ($32.4 \cdot 10^{-3}$) gebracht wurde, um den Mikroorganismen Zeit für eine gewisse osmotische Regulation bzw. Adaptation zu geben.

In Tab. 5 sind die Ergebnisse der Extinktion\Zeit-Plots für alle erhöhten Salzgehalte dargestellt.

I SALZGEH.	I KONZENTRATION [umol MUF-Leucin]								I Ausgangs- und	I
I ÄNDERUNG	0.5	1.0	1.5	2.0	3.0	7.5	20.0	80.0	I Versuchs-SG.	I
I in %	I Regressionsgeraden-Steigung [umol/min]								I insitu Versuch	I
I-----I										
I 72.40	I .014	.022	.031	.035	.044	.075	.129	.282	I 11.45 - 19.74	I
I 104.47	I .007	.013	.015	.017	.023	.043	.081	.132	I 12.08 - 24.70	I
I 134.85	I .003	.010	.014	.017	.024	.049	.091	.196	I 13.20 - 31.00	I
I 142.88 #	I .011	.013	.017	.020	.021	.041	.072	.150	I 13.34 - 32.40	I
I 122.08	I .019	.028	.033	.038	.042	.063	.103	.186	I 13.54 - 30.07	I
I-----I										
I 115.33	I .011	.017	.022	.025	.031	.054	.096	.189	I MITTELWERTE	I
I 28047.	I 6.18	7.53	9.22	10.3	11.2	14.5	20.9	58.0	I SD * 10 ³	I
I-----I										
I F-TEST	I 1.48	1.50	1.24	1.09	1.66	2.09	7.71		I F krit. = 6.390	I
I t-TEST	I (-)	1.38	0.94	0.65	0.88	2.81	3.69	3.37	I t-krit. = 2.306	I
I-----I										
I Tab. 5:	I Steigungen der Regressionsgeraden im Fluoreszenz\Zeit Plot									I
I	I in Abhängigkeit vom Versuchssalzgehalt; MUF-Leucin;									I
I	I #: langsame Aufsalzung ueber 3 Stunden									I

Bei der Auswertung der Fluoreszenz\Zeit-Plots zeigte sich auch für die experimentell erhöhten Salzgehalte eine deutliche Zunahme der Steigungen der den jeweiligen MUF-Leucin Substrat-Konzentrationen entsprechenden Regressionsgeraden. Die gemessenen Geradensteigungen sind in Tab. 5 dargestellt; Abb. 18 zeigt die Schwankungen der Regressionsgeraden-Steigungen in Abhängigkeit vom vorliegenden Versuchssalzgehalt.

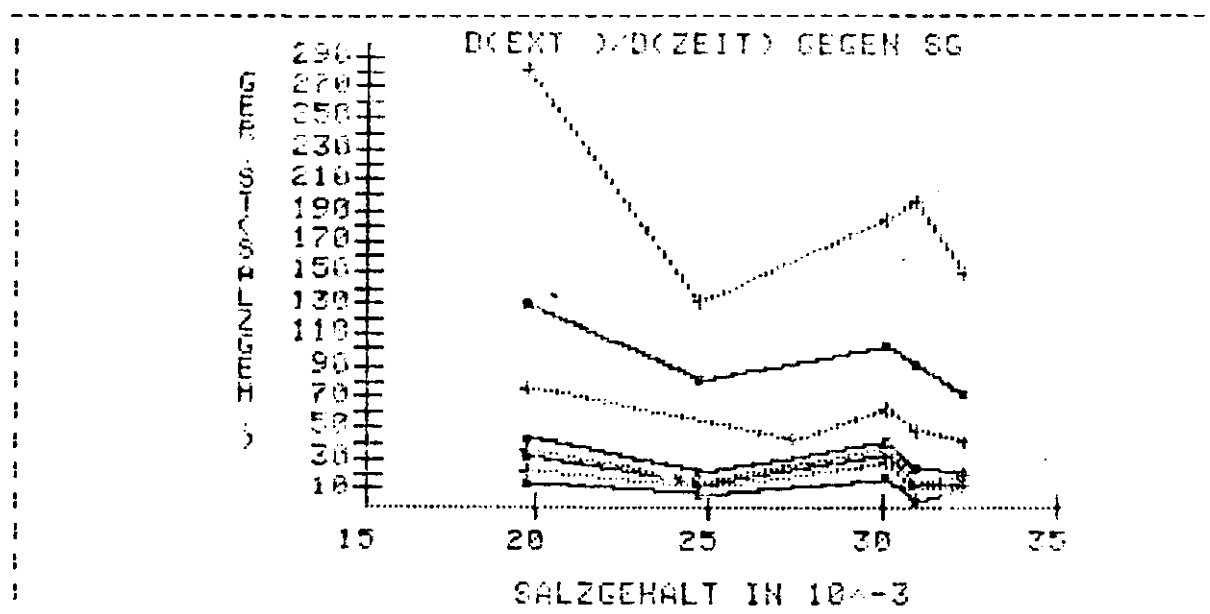


Abb. 18: Schwankungen der Regressionsgeraden-Steigungen im Fluoreszenz\ZeitPlots in Abhaengigkeit vom experimentell erhoehtem Salzgehalt.

Die Durchfuehrung einfacher statistischer Tests (F- und t-Test) ergibt auch fuer die aufgesalzenen Proben ein aehnliches Bild wie fuer die insitu-Salzgehalte; die Unabhaengigkeit der Mittelwerte ist erst zwischen 3.0 und 7.5 μmol nachzuweisen, so dass in dieser Hinsicht kein Einfluss der Versuchsbedingungen festzustellen ist.

Vergleicht man die Mittelwerte der Geradensteigungen in den Fluoreszenz\Zeit-Plots der aufgesalzenen Proben mit denen der insitu-Salzgehalt-Proben mit Hilfe des t-Tests fuer abhaengige Mittelwerte, so zeigt sich in allen Faellen, dass die Mittelwerte aus der selben Grundgesamtheit stammen.

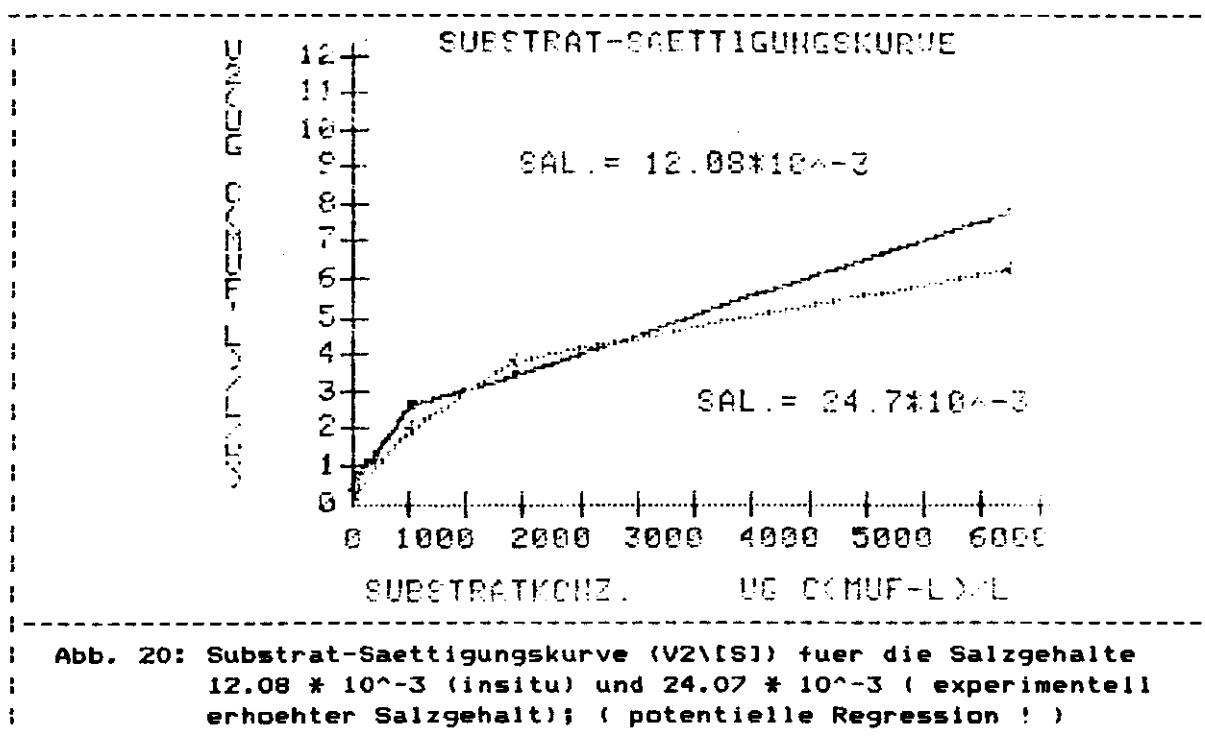
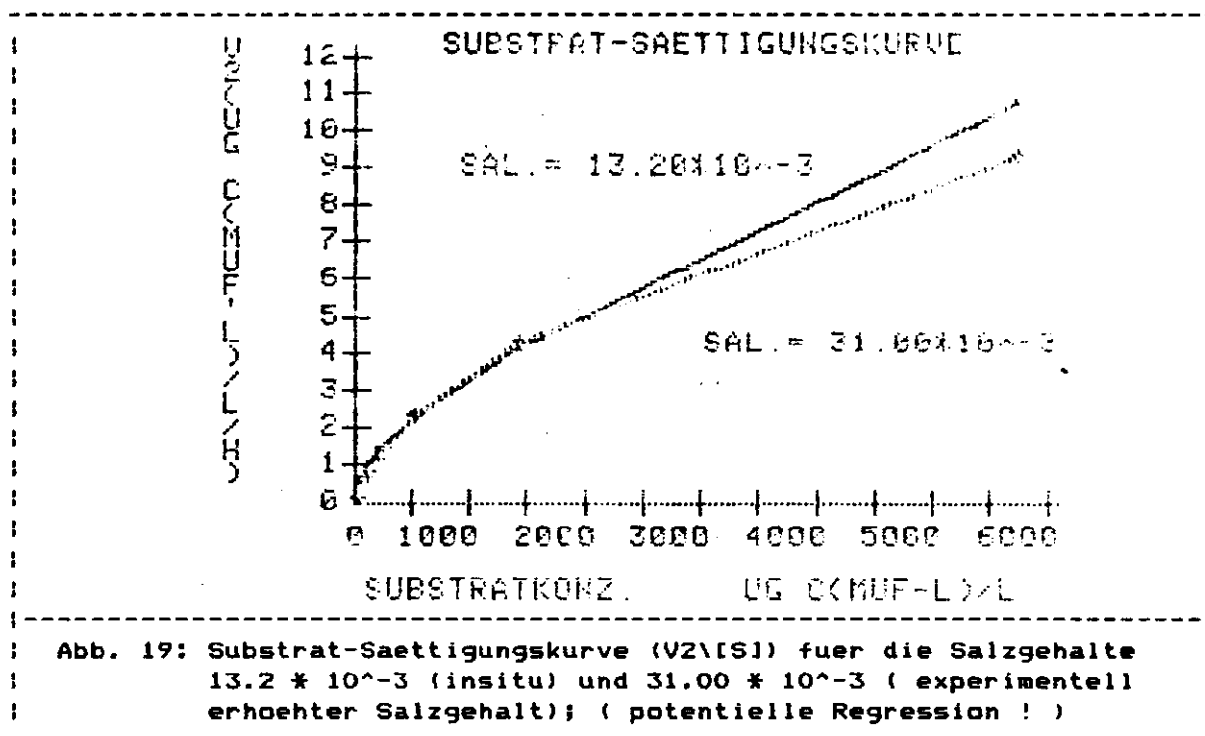
I SUBSTRATKONZ.	:I 0.5	1.0	1.5	2.0	3.0	7.5	20.0	80.0 [$\mu\text{mol/L}$]	I
I t (ABHAENGIGE MW):	I 0.71	2.36	1.56	1.53	1.77	0.94	-2.98	-0.25	I
I TAB. 6 : T-Test fuer die Geradensteigungen in den Fluoreszenz\Zeit-	I								I
I Plots; insitu-Salzgehalt gegen Versuchssalzgehalte.	I								I
I df =4; t(krit.) = 2.776 fuer P = 95%.	I								I

Berechnet man aus den vorliegenden Daten die Substrat-Saettigungskurven ($VZ/[S]$) (Abb. 19, 20, 21, 22 und 23), so zeigen diese ebenso wie die Daten fuer insitu-Salzgehalte nicht das zu erwartende Kurvenbild. Die Durchfuehrung der nichtlinearen Regression analog 3.1.1 zeigt, dass in allen Faellen eine potentielle Regression mit $r > 0.97$ vorliegt, waehrend die Korrelationskoeffizienten fuer exponentielle und logarithmische Regression jeweils unter $r = 0.97$ lagen (Tab. 7).

Dies zeigt, dass auch fuer die Daten fuer experimentell erhoehte Salzgehalte mathematisch keine Substrat-Saettigungssurve mit einem definierten Grenzwert vorliegt, bzw., dass eine theoretisch zu fordernde Substrat-saettigung erst bei sehr viel hoeheren Substratkonzentrationen erwartet werden kann.

I [S]	I	SALZGEHALT [*10 ⁻³]					I MITTEL-	I SD	I
I [UG C/L]	I	31.00	24.70	19.74	32.40#	30.07	I WERT	I*10 ⁺³	I
I	I						I	I	I
I 36	I	0.1368	0.3212	0.6696	0.5250	0.9063	I 0.5118	I 299.0	I
I 72	I	0.4896	0.6192	1.0512	0.6200	1.3356	I 0.8231	I 356.6	I
I 108	I	0.6408	0.7128	1.4760	0.8110	1.5741	I 1.0429	I 445.6	I
I 144	I	0.8136	0.8136	1.6704	0.9540	1.8126	I 1.2128	I 488.6	I
I 216	I	1.1448	1.0944	2.0952	1.2880	2.0034	I 1.5252	I 484.8	I
I 540	I	2.3400	2.0520	3.5784	1.9560	3.0050	I 2.5863	I 689.7	I
I 1440	I	4.3416	3.8664	6.1560	3.6730	4.9130	I 4.5900	I 997.9	I
I 5760	I	9.3456	6.2928	13.4496	7.1550	8.8720	I 9.0230	I 12768.8	I
I-----I									
I STATISTIK I-----I NICHTLINEARE REGRESSION I-----I									
I REGR. MOD.	I	r	r	r	r #	r	I ^	I ^	I
I	I						I	I	I
I POT. REGR.	I	0.9787	0.9934	0.9989	0.9971	0.9988	I 0.9934	I 8.5	I
I LOG. REGR.	I	0.9404	0.9636	0.9344	0.9414	0.9533	I 0.9466	I 11.7	I
I EXP. REGR.	I	0.7600	0.7958	0.8382	0.8499	0.8523	I 0.8192	I 40.2	I
I-----I									
I Tab. 7 :	V2-Werte aus den Substrat-Saettigungskurven V2/[S] fuer								I
I	MUF-Leucin in Abhaengigkeit von Versuchssalzgehalten,								I
I	gemessen im Juni 1983 mit Wasser aus der Foerde;								I
I	V2= [ug C * L ⁻¹ * h ⁻¹].								I
I	Fuer die Gleichung des potentiellen Regressionsmodells								I
I	gilt: y= 0.051 *x ^{0.6013} ; r ² = ?? 0.7739 ??								I
I	# = langsame Aufsalzung ueber 3 h;								I

Die Durchfuehrung des F-Tests bezueglich der gemittelten r-Werte ergibt F-Werte von 1.89, 11.81 und 22.37 fuer df1= df2= 4 bei einem kritischen F-Wert von 6.39 fuer P= 95% und 16.0 fuer P= 99%; dies bedeutet, dass auch bei einer experimentellen schnellen Aenderung des Salzgehalts das potentielle Regressionsmodell fuer die Substrat-Saettigungskurve im Vergleich zum exponentiellen und logarithmischen Regressionsmodell signifikant verschiedene und damit bessere Daten liefert. Fuehrt man fuer das potentielle und das logarithmische Modell den t-Test fuer unabhaengige Mittelwerte durch, so errechnet sich ein t von 7.24 bei df= 8 bei einem kritischen t-Wert von 3.36 fuer P= 1% bzw. 5.04 fuer P= 0.1%; somit gilt die Verschiedenheit auch fuer den Vergleich der potentiellen mit der logarithmischen Regression.



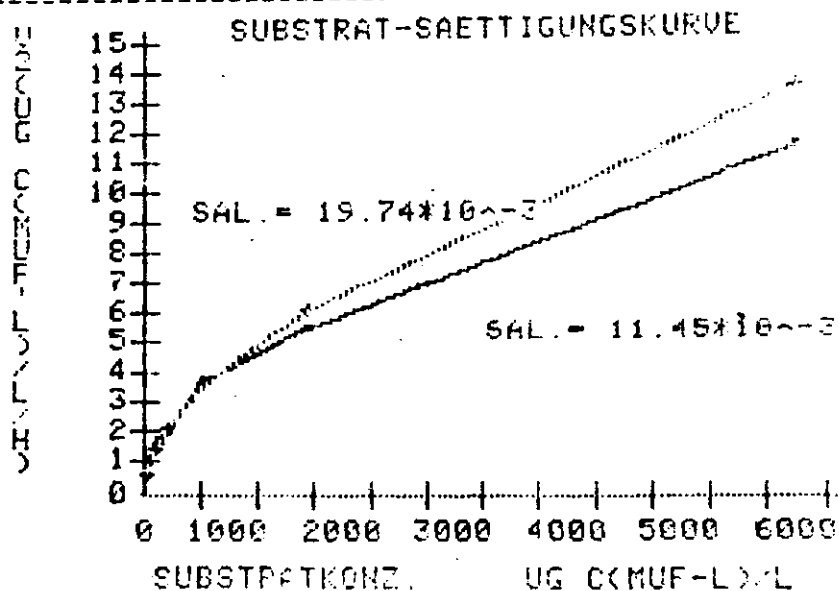


Abb. 21: Substrat-Saettigungskurve ($V_2/(S)$) fuer die Salzgehalte $11.45 \cdot 10^{-3}$ (insitu) und $19.74 \cdot 10^{-3}$ (experimentell erhoehter Salzgehalt); (potentielle Regression !)

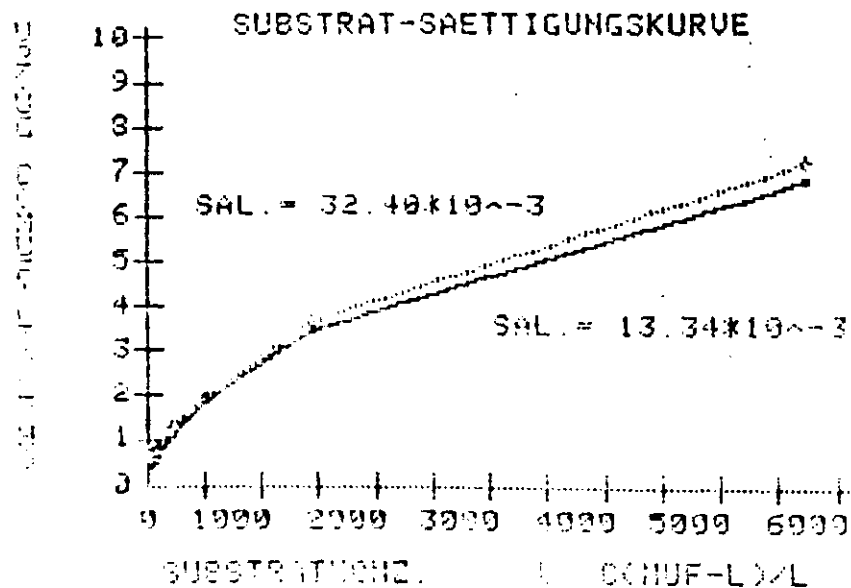
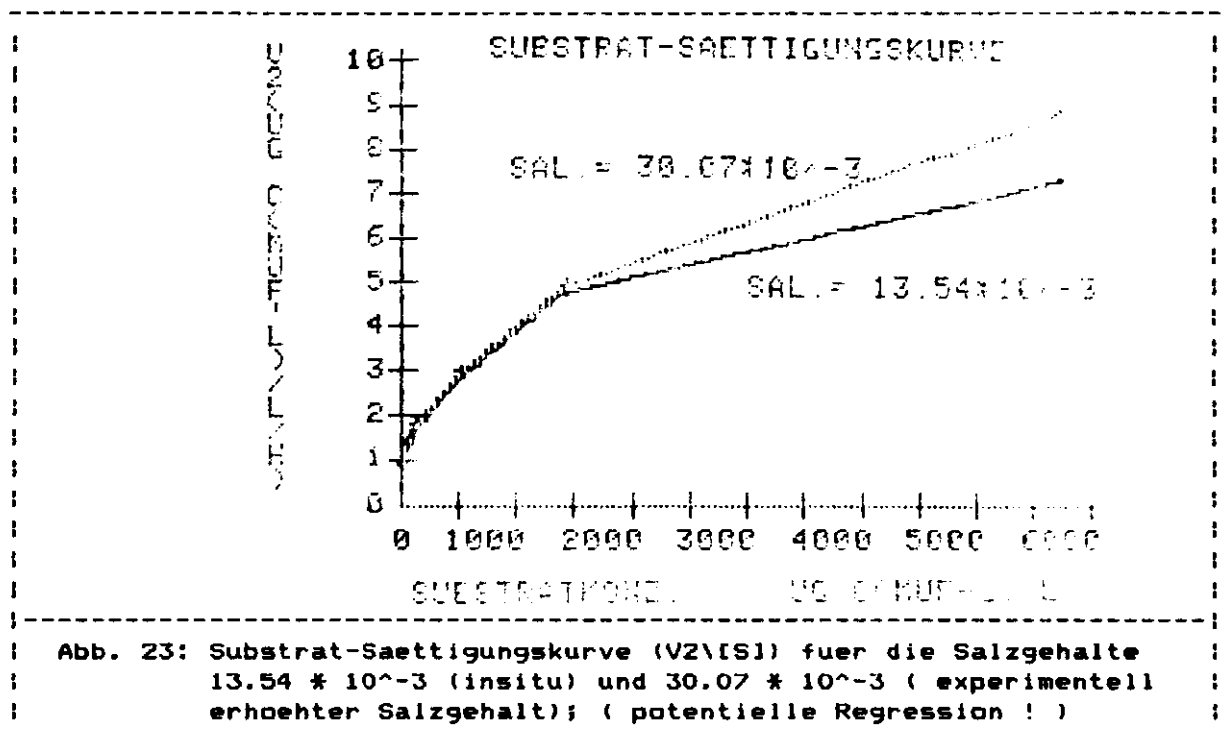


Abb. 22: Substrat-Saettigungskurve ($V_2/(S)$) fuer die Salzgehalte $13.34 \cdot 10^{-3}$ (insitu) und $32.40 \cdot 10^{-3}$ (experimentell erhoehter Salzgehalt; langsame Erhoehung ueber 3 Stunden); (potentielle Regression !)



Berechnet man fuer die obigen Daten das HANES-PLOT, ergeben sich die in Tab. 8 dargestellten Regressionsdaten.
Die HANES-PLOTS zu den jeweiligen Salzgehalten sind in den Abb. 24, 25 und 26 dargestellt.

I [S]	I SALZGEHALT [*10 ⁻³]	I MITTEL-	I STANDARD-	I
I [UG C/L]	I 31.00 24.70 19.74 #32.40 30.07	I WERT	I ABWEICHUNG	I
I-----I	I-----I	I-----I	I-----I	I-----I
I 36	I 260.25 107.82 53.91 68.61 39.72	I 106.06	I 89.86	I
I 72	I 147.99 116.11 68.61 116.13 53.91	I 100.55	I 38.51	I
I 108	I 167.72 150.95 73.04 133.19 68.61	I 118.70	I 45.41	I
I 144	I 177.58 177.58 86.26 150.95 79.46	I 134.37	I 48.32	I
I 216	I 188.68 196.89 102.92 215.64 107.82	I 158.43	I 51.24	I
I 540	I 231.04 263.28 150.95 276.12 179.70	I 220.22	I 53.70	I
I 1440	I 331.75 372.71 234.03 392.07 293.11	I 324.73	I 63.47	I
I 5760	I 616.11 914.83 428.22 805.05 649.23	I 682.69	I 186.53	I
I-----I	I-----I	I-----I	I-----I	I-----I
I I	I	I	I	I
I STATISTIK	I -----NICHTLINEARE REGRESSION-----	I MITTEL-	I STANDARD-	I
I REGR. MOD.	I -----KORRELATIONSKOEFFIZIENT ----	I WERT	I ABWEICHUNG	I
I-----I	I-----I	I-----I	I-----I	I-----I
I	I r r r # r r	I	I	I
I	I	I	I	I
I LINEARE R.	I 0.9704 0.9928 0.9694 0.9660 0.9820	I 0.9761	I 0.0111	I
I POTENT. R.	I 0.8551 0.9870 0.9977 0.9950 0.9990	I 0.9668	I 0.0626	I
I	I	I	I	I
I-----I	I--- STEIGUNGEN + ACHSENABSCHNITT ---	I-----I	I-----I	I-----I
I	I	I	I	I
I m(lin.R.)	I 0.0760 0.1354 0.0626 0.1180 0.1030	I 0.0990	I 0.0298	I
I m(pot.R.)	I 0.2256 0.4132 0.4170 0.4010 0.5590	I 0.4032	I 0.1184	I
I	I	I	I	I
I b(lin.R.)	I 186.14 146.76 84.67 152.47 76.99	I 129.41	I 46.9058	I
I b(pot.R.)	I 66.62 21.61 11.19 14.63 5.14	I 23.84	I 24.6457	I
I	I	I	I	I
I-----I	I-----I	I-----I	I-----I	I-----I
I Tab. 8:	I [S]/V2-Werte aus dem HANES-PLOT (([S]/V2)\[S]) fuer	I	I	I
I	I MUF-Leucin in Abhaengigkeit vom Versuchssalzgehalt,	I	I	I
I	I gemessen im Wasser der Kieler Foerde im Juni 1983;	I	I	I
I	I [S]/V2 = [ug C/L/h]. (#= langsame Aufsalzung ueber 3 h)	I	I	I
I	I Fuer das lineare Regressionsmodell gilt: y= mx + b;	I	I	I
I	I Fuer das potentielle Regressionsmodell gilt: y= mx^b	I	I	I

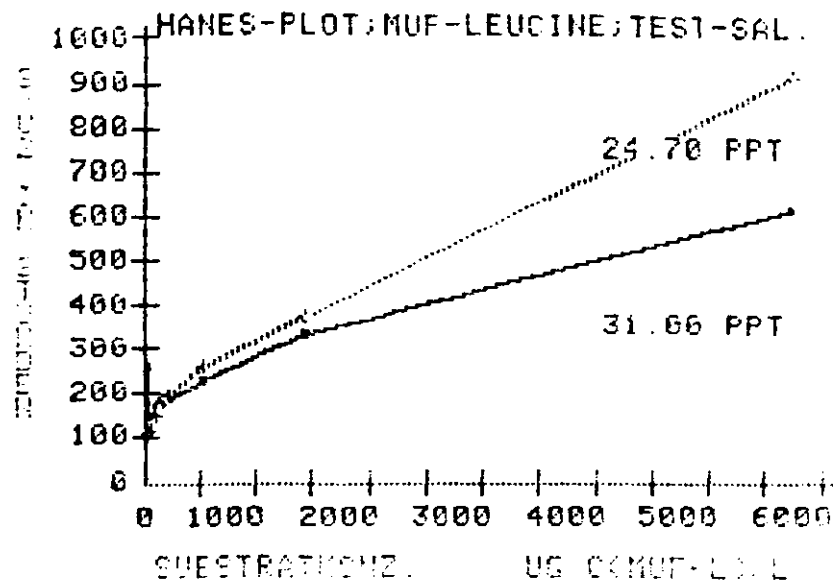


Abb. 24: HANES-PLOT fuer die Versuchssalzgehalte von $31.00 \cdot 10^{-3}$ und $24.70 \cdot 10^{-3}$; fuer dieses Plot wurde je eine Ausgleichsgerade berechnet.

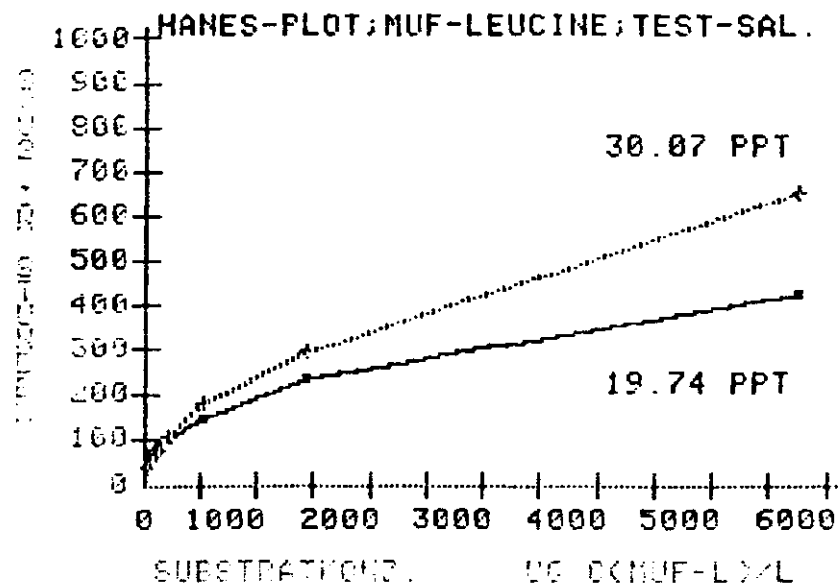


Abb. 25: HANES-PLOT fuer die Versuchssalzgehalte von $19.74 \cdot 10^{-3}$ und $30.07 \cdot 10^{-3}$; fuer dieses Plot wurde keine Ausgleichsgerade berechnet, sondern eine potentielle Regressionskurve.

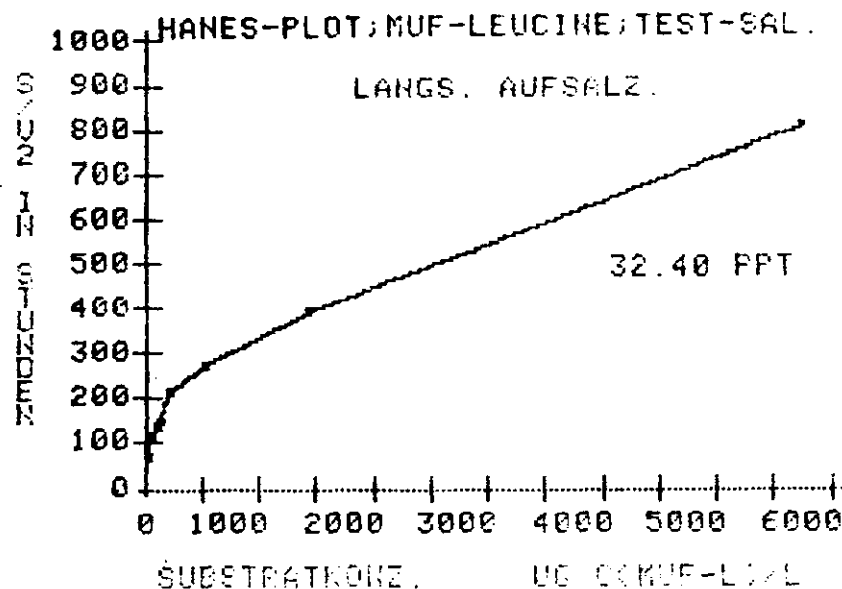


Abb. 26: HANES-PLOT fuer den Versuchssalzgehalt von $32.40 \cdot 10^{-3}$ mit langsamer Aufsalzung ueber 3 Stunden; (insitu-SG = $13.34 \cdot 10^{-3}$); fuer dieses Plot wurde keine Ausgleichsgerade, sondern eine potentielle Kurve berechnet.

Wie aus Tab. 8 und den Abb. 24, 25 und 26 ersichtlich ist, folgen diese Regressionskurven zum Teil dem potentiellen, zum Teil dem linearen Regressionsmodell. Der Mittelwert fuer r der linearen Regression hat sich gegenueber den insitu-Salzgehalt-Ergebnissen um 0.60 % verbessert, waehrend sich der Mittelwert fuer r der potentiellen Regression um 2.77 % verschlechtert hat. Diese Verschlechterung ist allerdings im wesentlichen auf den ungewoehnlich niedrigen r -Wert der potentiellen Regression fuer $31.00 \cdot 10^{-3}$ Testsalzgehalt zurueckzufuehren, der durch den hohen $IS1/V2$ -Wert von 36 $\mu\text{g C/L}$ bedingt wird. Insgesamt betrachtet ueberwiegt also immer noch das potentielle Modell das lineare Modell der MICHAELIS-MENTEN-KINETIK.

Tab. 9 gibt die Steigungen von Substratkonzentration zu Substratkonzentration fuer jeweils einen Test-Salzgehaltswert wieder, wobei die Daten von Tab. 8 die Berechnungsbasis bilden.

I [S]	I	I SALZGEHALTE [*10 ⁻³]					I MITTEL-	I	SD	I
I [UG C/L]	I	31.00	24.70	19.74	#32.40	30.07	I WERT	I		I
I 36 - 72	I (-3.118)	0.230	0.408	1.320	0.394		I 0.588	I	0.495	I
I 72 - 108	I 0.548	0.968	0.123	0.474	0.408		I 0.504	I	0.305	I
I 108 - 144	I 0.274	0.740	0.367	0.493	0.301		I 0.434	I	0.188	I
I 144 - 216	I 0.154	0.268	0.231	0.899	0.394		I 0.389	I	0.298	I
I 216 - 540	I 0.131	0.205	0.149	0.187	0.222		I 0.179	I	0.038	I
I 540 - 1440	I 0.112	0.122	0.092	0.129	0.126		I 0.116	I	0.015	I
I 1440 - 5760	I 0.066	0.126	0.045	0.096	0.082		I 0.092	I	0.031	I
I STATISTIK:	I	I TRENDLINIENBERECHNUNG					I MITTEL-	I	SD	I
I LIN. REG.	I	I y = mx + b					I WERT	I		I
I STEIGUNG:	I	m	m	m	m #	m	I	I		I
I	I	-.0852	-.0908	-.0489	-.1668	-.0564	I -0.0896	I	0.047	I
I KORR.KOEFF.	I	r	r	r	r #	r	I	I		I
I	I	-.8884	-.5859	-.7588	-.7957	-.9044	I -0.7866	I	0.128	I
I t-WERT(p=5%)	I	t	t	t	t #	t	I	I		I
I t krit=2.57	I	3.8708	1.6168	2.6047	2.9380	4.7404	I 3.1541	I	1.198	I
I Tab. 9: Verlauf der Steigungen zwischen den einzelnen Wertepaaren										
I im HANES-PLOT in Abhaengigkeit vom Versuchssalzgehalt.										
I Die Trendlinien sprechen fuer die Nichtlinearitaet der										
I Daten der HANES-PLOTS. (#: langsame Aufsatzung ueber 3 h)										

Aus Tab. 9 wird ersichtlich, dass nur fuer 1 HANES-PLOT mit einem Versuchssalzgehalt von 24.70 *10⁻³ kein signifikanter linearer Trend vorliegt. Dies ist allerdings im wesentlichen durch den ersten Wert (0.23) bedingt. Unter der Annahme, dass dieser Wert als Ausreisser zu betrachten ist, liegt fuer die restlichen Daten eine lineare Korrelation von r= 0.91 vor. Dies haette zur Folge, dass dann alle 5 HANES-PLOTS einen signifikanten linearen Trend in den Steigungen aufweisen, so dass das MICHAELIS-MENTEN-MODELL auch fuer die schnellen Aufsatzungen nur eingeschaenkt gelten kann !

Dies gilt analog auch fuer die langsame Aufsatzung.

Abb. 27 stellt das Ergebnis der Tabelle 9 nochmals in einer Zusammenfassung graphisch dar.

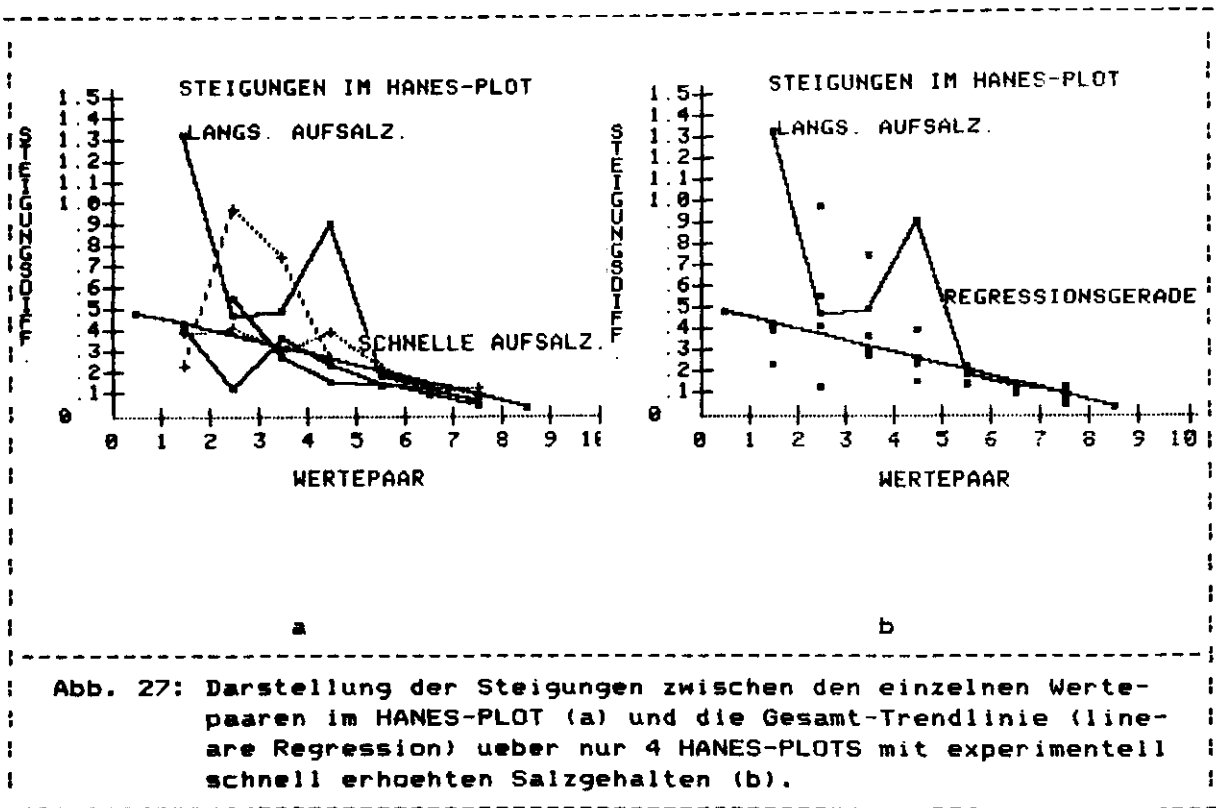


Abb. 27: Darstellung der Steigungen zwischen den einzelnen Wertepaaren im HANES-PLOT (a) und die Gesamt-Trendlinie (lineare Regression) ueber nur 4 HANES-PLOTS mit experimentell schnell erhoehten Salzgehalten (b).

Um die Wirkung der experimentellen Salzgehaltsveraenderung durch schnelles Aufsalzen allgemein zu untersuchen, soll im folgenden ein Vergleich der Steigungsaenderungen zwischen 2 aufeinanderfolgenden Wertepaaren bei insitu- und bei Versuchssalzgehalten durchgefuehrt werden.

Bildet man die Differenz aus den Steigungsaenderungen in den HANES-PLOTS fuer insitu- und Versuchssalzgehalte (Tab. 9 - Tab. 4), so entsteht eine resultierende Kurve, die Veraenderungen zwischen 2 benachbarten Substrat-Konzentrationen in Abhaengigkeit vom insitu- und Versuchssalzgehalt darstellt. Bildet man ueber alle nach diesem Verfahren berechneten Kurvendaten eine Trendlinie mit Hilfe der linearen Regression, so gibt die moeglicherweise nachgewiesene Trendlinie eine generelle Wirkung der unter den o. g. Bedingungen durchgefuehrten Salzgehaltsveraenderungen wieder.

Fuer die Daten aus Tab. 9 und Tab. 4 zeigt sich folgendes in Tab. 10 dargestelltes Ergebnis:

```

-----
I {S}          I SALZGEHALTE [ * 10^-3 ]      (INSITU / TEST )      I
I {UG C/L}I 13.20/31.00 12.08/24.70 11.45/19.74 13.34/32.40 13.54/30.07I
I-----I-----I-----I-----I-----I-----I-----I
I 36- 72I (-3.9693 ) I ( 1.8033 )I 0.1153 I 0.6210 I -0.1498 I
I 72- 108I 0.0011 I 0.4438 I -0.0679 I -0.4301 I 0.0563 I
I 108- 144I -0.2251 I 0.2387 I 0.1342 I 0.0003 I -0.1156 I
I 144- 216I -0.0178 I -0.1548 I -0.0666 I 0.5755 I 0.1174 I
I 216- 540I -0.0993 I 0.0799 I 0.0252 I -0.1283 I -0.0471 I
I 540-1440I -0.0131 I -0.1194 I -0.0357 I -0.0242 I 0.0296 I
I1440-5760I 0.0218 I 0.0515 I -0.0110 I -0.0054 I -0.0296 I
I-----I-----I-----I-----I-----I-----I-----I
I TREND- I m= +0.019 I m= -0.080 I m= -0.015 I m= -0.043 I m= +0.012 I
I LINIE I r= 0.3789 I r= -0.666 I r= -0.395 I r= -0.043 I r= 0.267 I
I (LIN.R.)I t= 0.819 I t= 1.787 I t= 0.960 I t= 0.560 I t= 0.620 I
I-----I-----I-----I-----I-----I-----I-----I
I Tab 10 : Differenzen aus den Steigungsänderungen in den HANES- I
I PLOTS fuer insitu- und Versuchssalzgehalte; I
I die Datenbasis bilden Tab. 4 und 9. I
I Die kritischen t-Werte sind: t(df(4)) = 2.776; P = 5% I
I t(df(5)) = 2.571; P = 5% I
I-----I-----I-----I-----I-----I-----I-----I

```

Wie Tab. 10 deutlich macht, ist durch die Aufsalzung kein signifikanter linearer Trend in den Steigungsdifferenzen der jeweiligen HANES-Daten entstanden. Dies zeigt, dass ueber alle Einzelkonzentrationen kein signifikanter Trend im Bezug auf eine Salzgehaltsveraenderung durch Aufsalzung zu erkennen ist.

Unter den o. g. Voraussetzungen haben die HANES-PLOTS also immer noch einen nichtlinearen Verlauf.

Es ist allerdings aus der Literatur bekannt (vgl. Einleitung), dass der HANES-PLOT bei gemischten Bakterienpopulationen und im Vergleich zu den Saettigungskonzentrationen sehr geringer Substratzugabe im unteren Konzentrationsbereich kaum Linearitaet zusammen mit den Werten fuer hoehere Konzentrationen ergibt. Letztere weisen unter sich meistens eine Linearitaet auf und ermoeglichen eine einwandfreie Berechnung von V_m . Wenn die aus niedrigen Substratzugaben resultierenden Werte mit in die Regressionsgerade einbezogen werden, sind fehlerhafte Werte fuer die nach dem HANES-PLOT errechenbaren T_t (Turnover-time) und K_m zu erwarten.

3.2.3 : Ergebnisse der Versuche mit veraenderter Temperatur:

Um den Einfluss von versuchsbedingten Temperaturaenderungen auf die Proben abschuetzen zu koennen, wurde je eine Wasserprobe mit einem urspruenglichen insitu-Salzgehalt von $13.54 \cdot 10^{-3}$, sowie einem daraus abgeleiteten Testsalzgehalt von $30.07 \cdot 10^{-3}$ auf 10 Grad Celsius ueber die jeweilige insitu-Temperatur langsam erwaermt, (RGT-Regel) und anschliessend wie eine der insitu-Proben behandelt. Die Ergebnisse fuer die insitu-Probe wurden bereits unter 3.2.1, die Ergebnisse der Probe mit experimentell erhoehtem Salzgehalt unter 3.2.2 beschrieben. Nachstehend werden nur die Ergebnisse der Proben mit erhoehter Temperatur dargestellt. Die Ergebnisse der Fluoreszenz\Zeit-Plot fuer die Proben mit erhoehter Temperatur zeigen gegenueber den insitu-Proben einheitlich hoehere Fluoreszenz (= Umsatzgeschwindigkeiten) ueber alle Substratkonzentrationen.

Vergleicht man die Substrat-Saettigungskurven von insitu-Proben, Proben mit experimentell erhoehtem Salzgehalt und Proben mit erhoehter Temperatur, so zeigt sich, dass die Umsatzgeschwindigkeiten im wesentlichen staerker von der Temperaturaenderung als von der Salzgehaltsaenderung beeinflusst wird (Abb. 28 und Tab. 11). Die Substrat-Saettigungskurven fuer experimentell erhoehte Temperaturen zeigen ebenso wie die bisherig dargestellten Substrat-Saettigungskurven nicht das zu erwartende Kurvenbild. Die Durchfuehrung der nichtlinearen Regression analog 3.1.1 zeigt, dass in allen Faellen eine potentielle Regression mit $r > 0.99$ vorliegt, waehrend die Korrelationskoeffizienten fuer exponentielle und logarithmische Regression jeweils unter $r < 0.98$ bzw. unter 0.86 lagen. (Tab. 11). Dies bedeutet, dass auch fuer diese Daten keine Substrat-Saettigungskurve mit einem definierten Grenzwert vorliegt.

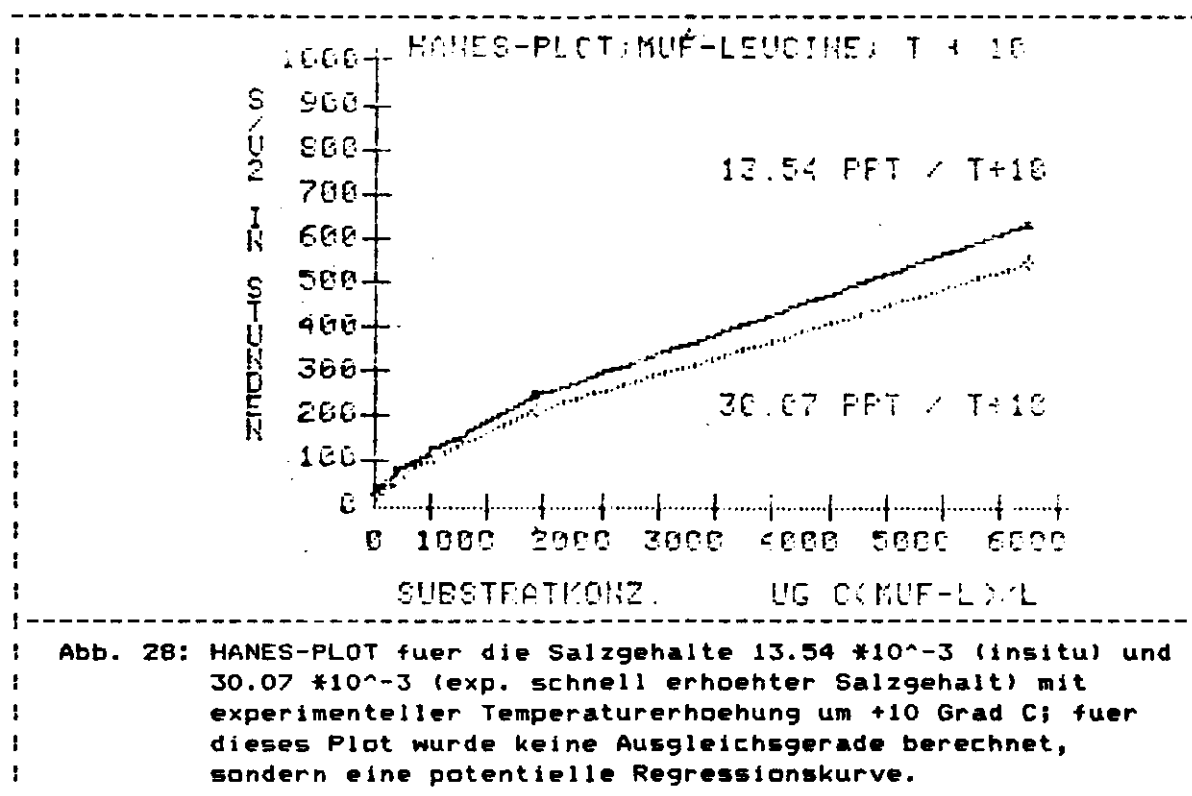
I [S]	I	SALZGEHALT [*10 ⁻³]				I MW	I MW	IMW T(e)	I
I [UG C/L]	I	13.54	13.54*	30.07	30.07*	I T(i)	I T(e)	IMW T(i)	I
I-----I	I-----I	I-----I	I-----I	I-----I	I-----I	I-----I	I-----I	I-----I	I-----I
I 36	I	1.0494	1.4787	0.9093	1.5264	I 0.9794	I 1.5026	I 1:1.5	I
I 72	I	1.3356	2.0988	1.3356	2.5280	I 1.3356	I 2.3134	I 1:1.7	I
I 108	I	1.6218	2.3849	1.5741	3.0527	I 1.5980	I 2.7188	I 1:1.7	I
I 144	I	1.7649	2.7665	1.8126	3.3389	I 1.7888	I 3.0527	I 1:1.7	I
I 216	I	1.9557	2.8142	2.0034	3.5774	I 1.9796	I 3.1958	I 1:1.6	I
I 540	I	2.8619	4.4837	3.0050	5.0084	I 2.9335	I 4.7461	I 1:1.6	I
I 1440	I	4.8176	5.8670	4.9130	6.7732	I 4.8653	I 6.3201	I 1:1.3	I
I 5760	I	7.3456	9.1105	8.8720	10.5415	I 8.1088	I 9.8260	I 1:1.2	I
I-----I	I-----I	I-----I	I-----I	I-----I	I-----I	I-----I	I-----I	I-----I	I-----I
I STATISTIK I----- NICHTLINEARE REGRESSION -----I I									
I REGR. MOD. I	I	r	r	r	r	I MW	I SD	I	I
I-----I	I-----I	I-----I	I-----I	I-----I	I-----I	I-----I	I-----I	I-----I	I-----I
I POT. REGR. I	I	0.9973	0.9953	0.9988	0.9863	I 0.9944	I 0.0056	I	I
I LOG. REGR. I	I	0.9665	0.9795	0.9533	0.9823	I 0.9704	I 0.0133	I	I
I EXP. REGR. I	I	0.8432	0.8216	0.8523	0.7998	I 0.8442	I 0.0234	I	I
I-----I	I-----I	I-----I	I-----I	I-----I	I-----I	I-----I	I-----I	I-----I	I-----I
I Tab. 11:	V2-Werte aus den Substrat-Saettigungskurven V2/[S] fuer								I
I	MUF-Leucin in Abhaengigkeit von Versuchssalzgehalten und								I
I	der Versuchstemperatur, gemessen im Juni 1983 mit Wasser								I
I	aus der Foerde;								I
I	V2= [ug C * L ⁻¹ * h ⁻¹].								I
I	* = Proben mit experimentell erhoehter Temperatur								I
I	T(i) = insitu-Temp.; T(e) = experimentell erhoehte Temp.								I
I-----I	I-----I	I-----I	I-----I	I-----I	I-----I	I-----I	I-----I	I-----I	I-----I

Es zeigt sich, dass die nach der RGT-Regel zu erwartende Verdoppelung der Umsatzgeschwindigkeiten nicht erfolgte; dies kann dadurch begründet sein, dass das im Versuch vorliegende Gemisch von Enzymen nicht den der RGT-Regel zugrunde liegenden theoretischen Bedingungen des Umsatzes von einem einzigen Substrat an einem einzigen Enzym entspricht. In der Regel wurde durch eine Temperaturerhöhung von 10 Grad Celsius die Umsatzgeschwindigkeit nur um den Faktor 1,2 - 1,7 erhöht.

Berechnet man fuer die obigen Daten das HANES-PLOT, ergeben sich die in Tab. 12 dargestellten Regressionsdaten. Die HANES-PLOTS zu den jeweiligen Salzgehalten mit insitu-Temperatur sind in den Abb. 16 und 25 dargestellt.

I [S]	I SALZGEHALT [*10 ⁻³]	I MITTEL-	I STANDARD-	I
I [UG C/L]	I 13.54 13.54% 30.07 30.07%	I WERT	I ABWEICHUNG	I
I 36	I 34.31 24.35 39.72 23.59	I 30.49	I 7.85	I
I 72	I 53.91 34.31 53.91 28.48	I 42.65	I 13.22	I
I 108	I 66.59 45.28 68.62 35.38	I 53.97	I 16.28	I
I 144	I 81.59 52.05 79.45 43.13	I 64.06	I 19.38	I
I 216	I 101.45 76.75 107.82 60.38	I 86.60	I 22.03	I
I 540	I 188.68 120.44 179.70 107.82	I 149.16	I 40.94	I
I 1440	I 298.90 245.44 293.11 212.60	I 262.51	I 41.00	I
I 5760	I 784.14 632.24 649.24 546.41	I 653.01	I 98.33	I
I ISTATISTIK	I -----NICHTLINEARE REGRESSION-----	I MITTEL-	I STANDARD-	I
I REGR. MOD.	I	I WERT	I ABWEICHUNG	I
I	I	I	I	I
I	I ----- KORRELATIONSKOEFFIZIENT -----	I	I	I
I	I r r r r	I	I	I
I LINEARE R.	I 0.9910 0.9930 0.9820 0.9920	I 0.9895	I 0.0051	I
I POTENT. R.	I 0.9990 0.9990 0.9990 0.9960	I 0.9983	I 0.0015	I
I	I	I	I	I
I	I --- STEIGUNGEN + ACHSENABSCHNITT ---	I	I	I
I	I	I	I	I
I m(lin.R.)	I 0.127 0.104 0.103 0.090	I 0.1060	I 0.0154	I
I m(pot.R.)	I 0.608 0.648 0.559 0.648	I 0.6158	I 0.0423	I
I	I	I	I	I
I b(lin.R.)	I 69.381 45.492 76.985 38.299	I 57.5393	I 18.5624	I
I b(pot.R.)	I 3.927 2.211 5.140 1.883	I 3.2903	I 1.5245	I
I	I	I	I	I
I Tab. 12: [S]/V2-Werte aus dem HANES-PLOT (([S]/V2)\[S]) fuer	I	I	I	I
I MUF-Leucin in Abhaengigkeit vom Versuchssalzgehalt und	I	I	I	I
I Temperatur, gemessen im Wasser der Kieler Foerde im Juni	I	I	I	I
I 1983;	I	I	I	I
I Fuer das lineare Regressionsmodell gilt: y= mx + b;	I	I	I	I
I Fuer das potentielle Regressionsmodell gilt: y= mx^b	I	I	I	I

Die Steigungen der HANES-PLOTS fuer erhoehte Temperaturen sind geringer als die Steigungen der HANES-PLOTS fuer insitu-Temperatur. Dies ist dadurch begruendet, dass eine geringere Steigung in diesen Plots eine hoehere Umsatzgeschwindigkeit ausdrueckt (m = 1/V2 !).



Wie aus Tab. 12, sowie der Abb. 28 ersichtlich ist, folgen diese Regressionskurven dem potentiellen Regressionsmodell.

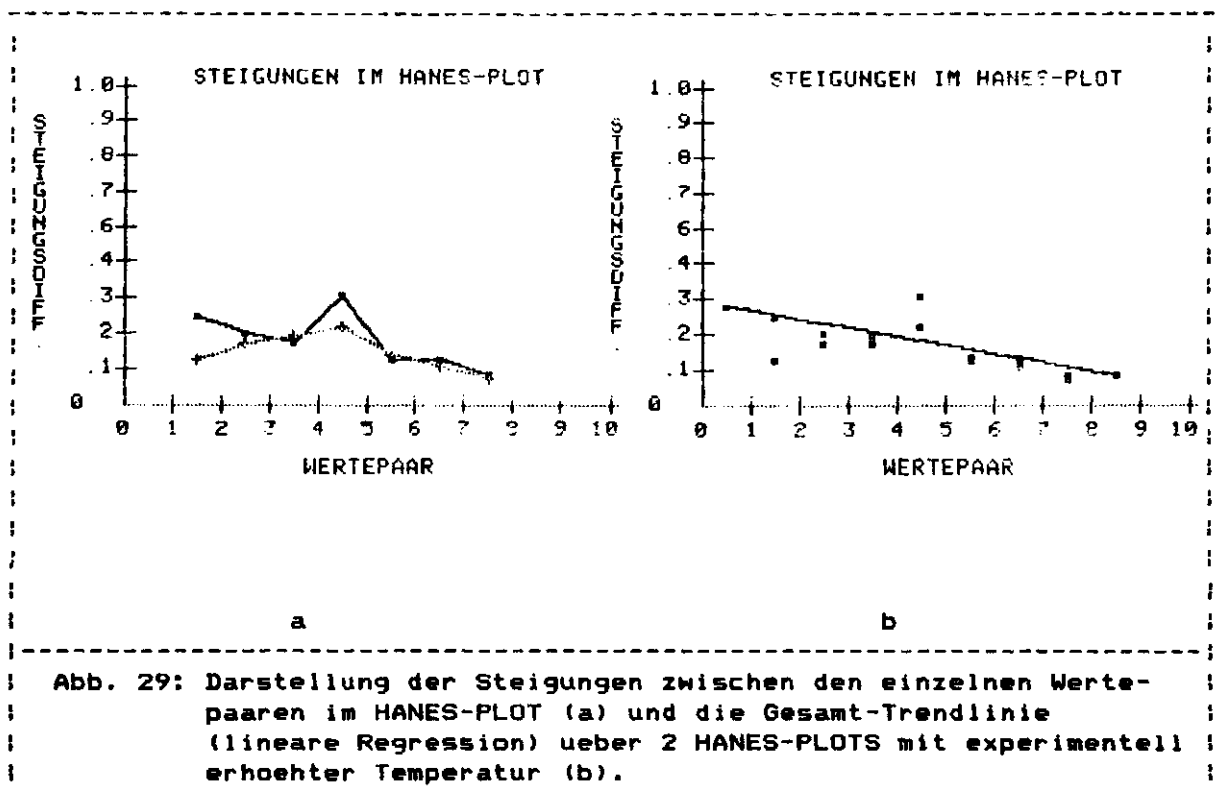
Tab. 13 gibt die Steigungen von Substratkonzentration zu Substratkonzentration fuer jeweils einen Test-Salzgehaltswert wieder, wobei die Daten von Tab. 12 die Berechnungsbasis bilden.

I (S)	I SALZGEHALTE [*10 ⁻³]	I MITTEL-	I SD	I
I [UG C/L]	I 13.54 13.54* 30.07 30.07*	I WERT	I	I
I 36 - 72	I 0.5440 0.2767 0.3940 0.1358	I 0.338	I 0.173	I
I 72 - 108	I 0.3520 0.2214 0.4080 0.1917	I 0.293	I 0.103	I
I 108 - 144	I 0.4170 0.1881 0.3010 0.2153	I 0.280	I 0.103	I
I 144 - 216	I 0.2760 0.3431 0.3940 0.2396	I 0.313	I 0.069	I
I 216 - 540	I 0.2690 0.1348 0.2220 0.1464	I 0.193	I 0.064	I
I 540 - 1440	I 0.1230 0.1389 0.1260 0.1164	I 0.126	I 0.009	I
I 1440 - 5760	I 0.1120 0.0895 0.0820 0.0773	I 0.090	I 0.015	I
I STATISTIK:	I ----- TRENDLINIENBERECHNUNG -----	I MITTEL-	I SD	I
I LIN. REG.	I y = mx + b	I WERT	I	I
I STEIGUNG:	I m m m m	I	I	I
I	I -.0679 -.0279 -.0564 -.0141	I -0.0416	I 0.025	I
I KORR.KOEFF.	I r r r r	I	I	I
I	I -.9468 -.6788 -.9044 -.5290	I -0.7648	I 0.196	I
I t-WERT(p=5%)	I t t t t	I	I	I
I t krit=2.57	I 6.5717 2.0669 4.7404 1.3940	I 3.6933	I 2.402	I
I Tab. 13: Verlauf der Steigungen zwischen den einzelnen Wertepaaren I				
I im HANES-PLOT in Abhaengigkeit von Versuchssalzgehalt und I				
I Versuchstemperatur. I				
I Die Trendlinien fuer die Versuche mit insitu-Temperatur I				
I sprechen fuer die Nichtlinearitaet der Daten in den I				
I HANES-PLOTS, die Trendlinien fuer die Versuche mit experi-I				
I mentell erhoehter Temperatur sprechen fuer eine Linearit-I				
I taet der Daten der HANES-PLOTS; I				
I t(krit.) fuer df=5 = 2.571; (*: insitu-Temp. + 10 Grad C.)I				

Wie aus Tab. 13 ersichtlich wird, liegt fuer die HANES-PLOT mit experimentell erhoehter Versuchstemperatur kein signifikanter linearer Trend in den Steigungsdifferenzen zwischen den einzelnen Wertepaaren vor, was zur Folge hat, dass das Ergebnis des t-Tests eine Parallele zur x-Achse wahrscheinlich macht und damit eine Linearitaet der HANES-PLOTS fuer diese Daten annimmt. Unter den vorliegenden Voraussetzungen kann das MICHAELIS-MENTEN-MODELL fuer die Versuche mit erhoehter Temperatur mit zu vernachlaessigendem Fehler gelten !

Wie gezeigt wurde ist der Einfluss der Temperatur auf die Umsatzaktivitaet hoeher als der Einfluss des Salzgehaltes.

Abb. 29 stellt das Ergebnis der Tabelle 13 nochmals graphisch dar.



Bildet man die Differenz aus den Steigungsaenderungen in den HANES-PLOTS fuer insitu- und Versuchstemperatur fuer die jeweiligen insitu- und Versuchssalzgehalte ($dm(T+) - dm(Ti)$), so zeigt sich nach Einbeziehung aller Daten in die Trendlinienanalyse folgendes in Tab. 14 dargestelltes Ergebnis ueber die generelle Tendenz der Wirkung einer unter den o.g. experimentellen Bedingungen durchgefuehrten Temperaturerhoehung:

I	[S]		I	SALZGEHALTE [* 10 ⁻³]		(INSITU / TEST)		I	
I	[UG C/L]		I	13.54	I	30.07	I	MITTELWERT	I
I	-----		I	-----	I	-----	I	-----	I
I	36	- 72	I	-0.267	I	-0.258	I	-0.263	I
I	72	- 108	I	-0.131	I	-0.216	I	-0.174	I
I	108	- 144	I	-0.229	I	-0.086	I	-0.158	I
I	144	- 216	I	-0.067	I	-0.154	I	-0.044	I
I	216	- 540	I	-0.134	I	-0.076	I	-0.105	I
I	540	- 1440	I	+0.016	I	-0.010	I	+0.003	I
I	1440	- 5760	I	-0.023	I	-0.005	I	-0.014	I
I	-----		I	-----	I	-----	I	-----	I
I			I		I		I		I
I	TRENDLINIE		I	m= -0.040	I	m= +0.042	I	m= +0.041	I
I	Y = mx + b		I	r= 0.834	I	r= 0.929	I	r= 0.920	I
I	(LIN. REGRESSION)		I	t= 3.380	I	t= 5.635	I	t= 5.264	I
I	t(krit.;P=5%)= 2.57		I		I		I		I
I	-----		I	-----	I	-----	I	-----	I
I	Tab 14 : Differenzen aus den Steigungsänderungen in den HANES-								I
I	PLOTS fuer insitu- und Versuchstemperatur in Abhängig-								I
I	keit vom Versuchssalzgehalt.								I

Wie Tab. 14 deutlich macht, ist durch die Temperaturerhoehung ein signifikanter linearer Trend in den Steigungsdifferenzen der jeweiligen HANES-Daten entstanden. Die beiden HANES-PLOTS haben unter den o. g. Voraussetzungen jeder fuer sich einen verschiedenen Trend entwickelt, obwohl in der Summe dann allerdings immer noch ein signifikanter linearer Trend vorliegt. Dies ist ein Hinweis dafuer, dass der Steigungswert $+0.042$ durch einen Ausreisserwert fuer die Differenz zwischen 4. und 5. Wertepaar bedingt ist. Daraus ist dann zu schliessen, dass bei den unter den o. g. Bedingungen durchgefuehrten Versuchen mit experimenteller Temperaturerhoehungen eine Erhoehung der Umsatzraten besonders bei niedrigen Substanzugaben erfolgte und somit eine bessere Anpassung der Daten an die MICHAELIS-MENTEN-GLEICHUNG gegeben ist.

Wie aus Tab. 11 ersichtlich ist, liegen fuer alle Versuche mit erhoehter Temperatur grundsaeztlich hoehere Umsatzgeschwindigkeiten vor. Gleichzeitig hat eine Linearisierung in den HANES-PLOTS eingesetzt. Dies ist in erster Linie auf die Wertepaare 2, 3 und 4 zurueckzufuehren. Die Abnahme der Steigungsaenderungen in Tab. 14 fuer insitu-Salzgehalte ist damit zu erklaren, dass die experimentelle Veraenderung nur eines einzelnen Faktors eine Erhoehung der Umsatzgeschwindigkeit bewirkt. Die Zunahme der Steigungen fuer erhoehte Salzgehalte in Tab. 14 ist u. a. auch damit zu erklaren, dass durch die Salzgehaltserhoehung eine geringere Anzahl von aktiven Bakterien angesprochen wird. Obwohl hier nach Tab. 11 eine Erhoehung der Umsatzgeschwindigkeit vorliegt, ist diese Umsatzgeschwindigkeit geringer als die insitu-Umsatzgeschwindigkeit, da insgesamt weniger Bakterien an den Umsatzprozessen beteiligt sind. Die Gesamttrendlinie weist somit auf signifikant geringere Steigungen und hoehere Umsatzraten in den HANES-PLOTS hin.

3.2.4 : Ergebnisse der Versuche mit veraendertem pH-Wert und Auswertung der Fluorescamin-Ergebnisse:

Um den Einfluss von versuchsbedingten pH-Schwankungen auf die Proben abschaeetzen zu koennen, wurde eine Wasserprobe mit einem urspruenglichen insitu-Salzgehalt von $13.00 \cdot 10^{-3}$ und einem insitu-pH von 8.6 auf die Veraenderungen der Umsatzaktivitaet im Vergleich zum insitu-pH-Wert bei einem experimentell veraendertem pH-Wert von insitu-pH ± 2 untersucht. Die Veraenderung des pH-Wertes wurden durch Zugabe von 1 normaler HCl bzw. 1 normaler NaOH bis zum gewuenschten pH-Wert erreicht. Anschliessend wurden alle Proben wie eine insitu-Probe behandelt. Zur Verfolgung der in den Proben vorhandenen bzw. freigesetzten freien geloesten primaeren Aminosaeuren wurde gleichzeitig die Konzentration dieser Substanzen mit der Fluorescamin-Methode (NORTH 1975) bestimmt.

SUBSTRAT- KONZENTRATION [umol/L]	EXTINKTIONEN [%]		GERADENPARAMETER $y = m \cdot x + b$	
	0 MINUTEN	420 MINUTEN	m	b
INSITU-SALZGEHALT				
1.0 umol/L	0.74	1.33	0.0014	0.74
7.5 umol/L	4.25	4.61	0.0009	4.25
80.0 umol/L	25.75	29.50	0.0089	25.75
VERSUCHSSALZGEHALT				
1.0 umol/L	1.70	2.21	0.0012	1.70
7.5 umol/L	4.34	4.76	0.0010	4.76
80.0 umol/L	25.00	29.75	0.0107	25.00

Tab. 15: Extinktionswerte und die zugehoerigen Geradensteigungen fuer die Fluorescamin-Versuche bei Salzgehalten von $13.0 \cdot 10^{-3}$ (insitu) und $31.0 \cdot 10^{-3}$ (experim. erhoeht).

Die Ergebnisse der Fluoreszenz\Zeit-Plots fuer die Proben mit insitu-pH zeigen gegenueber den Proben mit veraendertem pH-Wert einheitlich hoehere Fluoreszenz-Zunahmen (= Umsatzgeschwindigkeiten) ueber alle Substratkonzentrationen.

Vergleicht man die Fluoreszenz\Zeit-Plots fuer insitu-Salzgehalt und experimentell erhoehten Salzgehalt, so zeigen bei niedrigen Substratkonzentrationen (1.0 umol/L) hoehere Fluoreszenz-Zunahmen fuer die Proben mit insitu-Salzgehalt; bei den hoeheren Substrat-Konzentrationen (7.5 umol/L) ergibt sich eine hoehere Steigung beim experimentell erhoehten Salzgehalt. Dies koennte ein Hinweis dafuer sein, dass in der Probe mindestens 2 verschiedene Bakterienpopulationen mit unterschiedlichen Anspruechen an ihre Umwelt vorhanden sind; z. B. eine Gruppe halophiler Bakterien mit hoeherer Aktivitaet bei geringen Substratkonzentrationen und eine Gruppe halotoleranter Bakterien mit hoeherer Aktivitaet bei hohen Substrat-Konzentrationen.

Die Fluorescamin-Versuche zeigen bei niedrigen Substrat-Konzentrationen (1.0 umol/L) und insitu Salzgehalt eine hoehere Aktivitaet, also eine staerkere Freisetzung primaerer Aminosaeuren, als bei einem experimentell schnell erhoehtem Salzgehalt von $31.0 \cdot 10^{-3}$, waehrend bei hoeheren Substrat-Konzentrationen (7.5 umol/L) und insitu Salzgehalt die Aktivitaet im Vergleich zum Versuchssalzgehalt niedriger ist.

Die Abb. 30 und 31 geben die jeweiligen Fluoreszenz\Zeit-Plots fuer die einzelnen Versuche bei insitu-Salzgehalt und insitu-Temperatur und experimentell veraendertem pH-Wert wieder.

Abb. 32 zeigt die Fluoreszenz\Zeit-Plots fuer insitu-Salzgehalt ($13.00 \cdot 10^{-3}$) und experimentell erhoehetem Salzgehalt ($31.00 \cdot 10^{-3}$) und Abb. 33 die zugehoerigen Ergebnisse der Fluorescamin-Versuche.

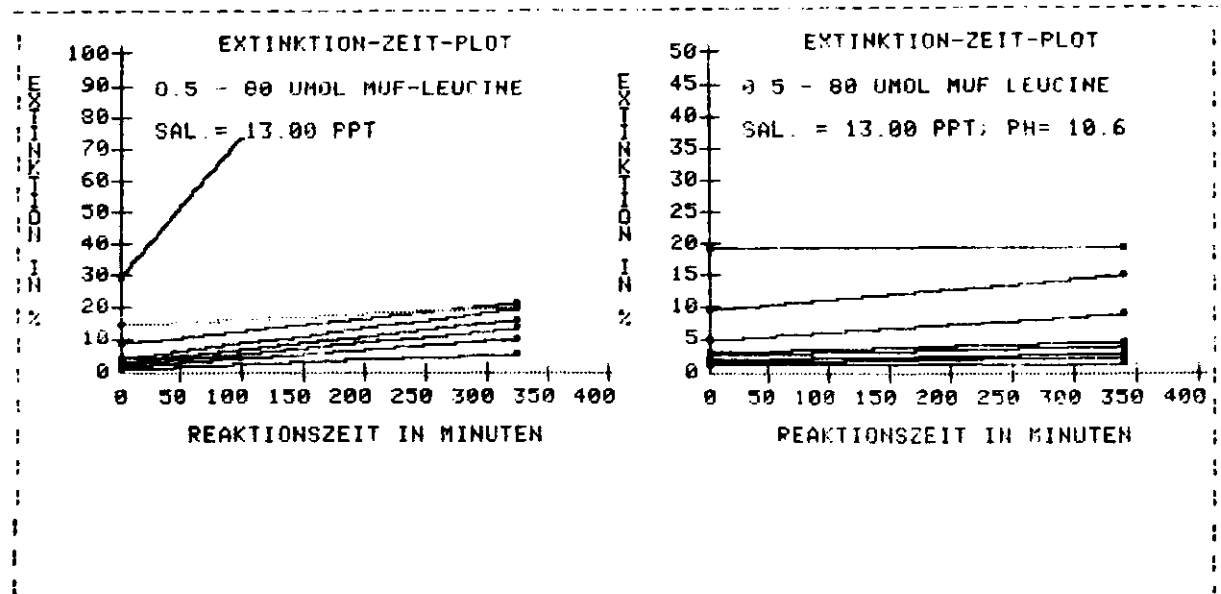
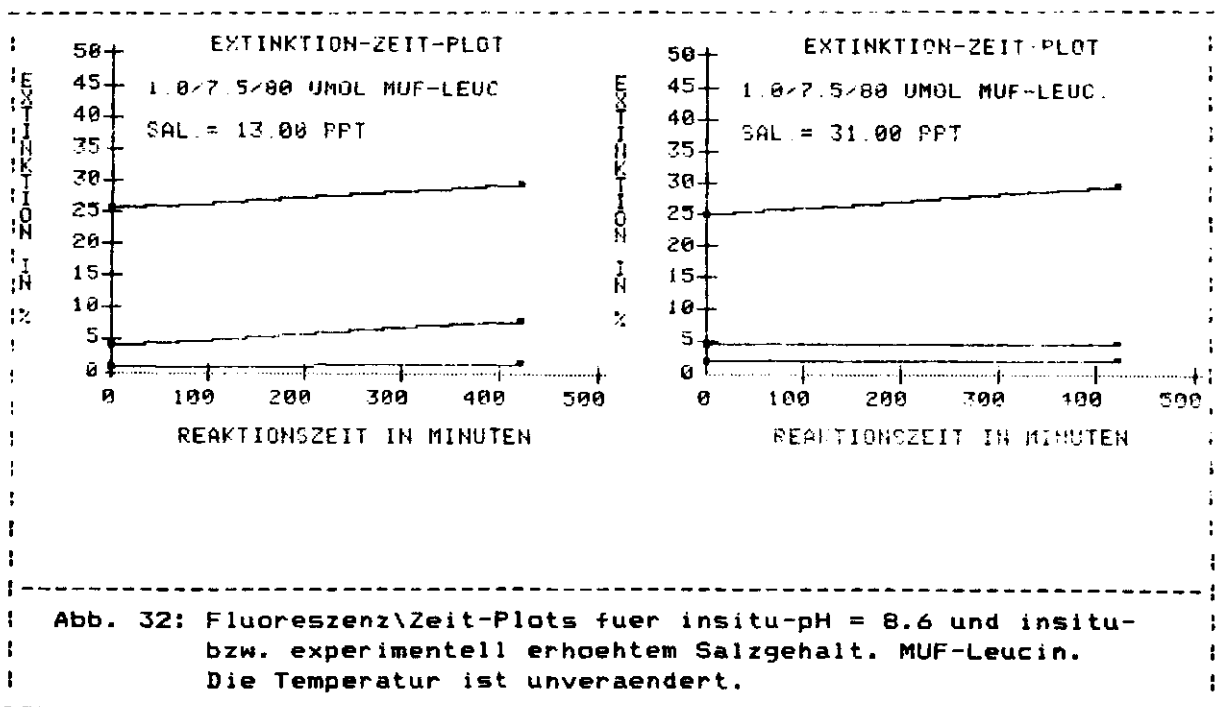
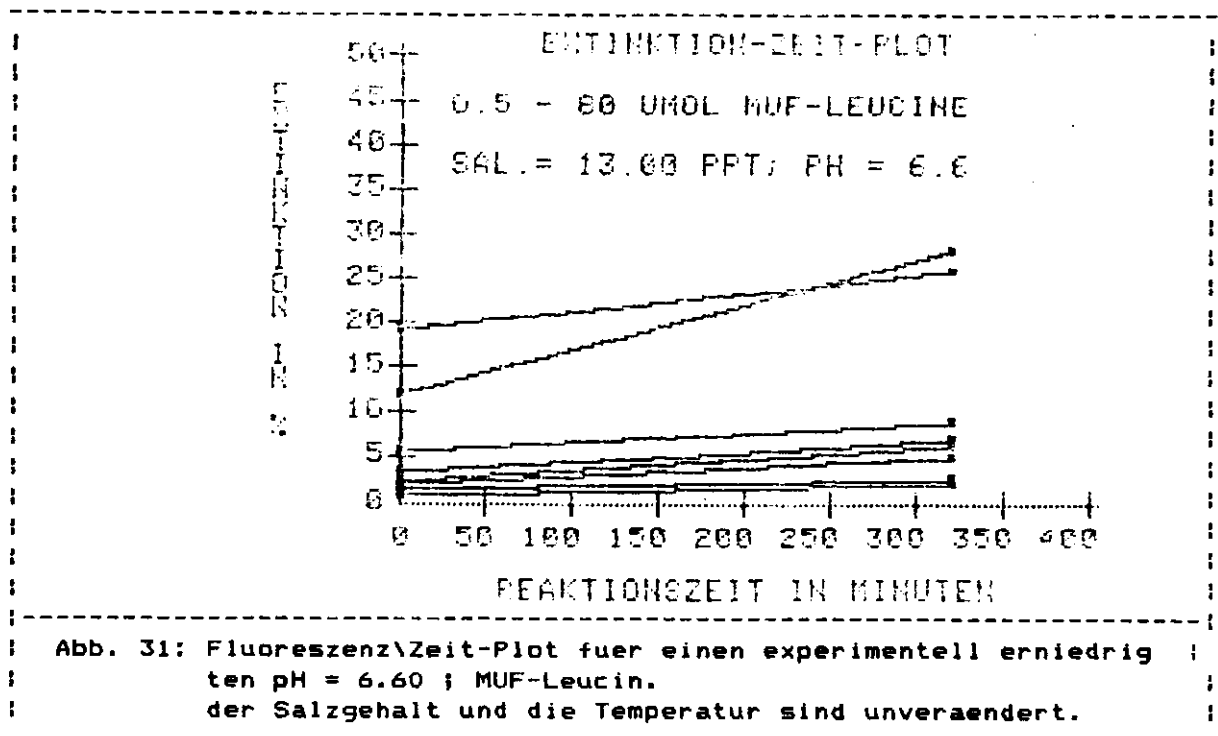
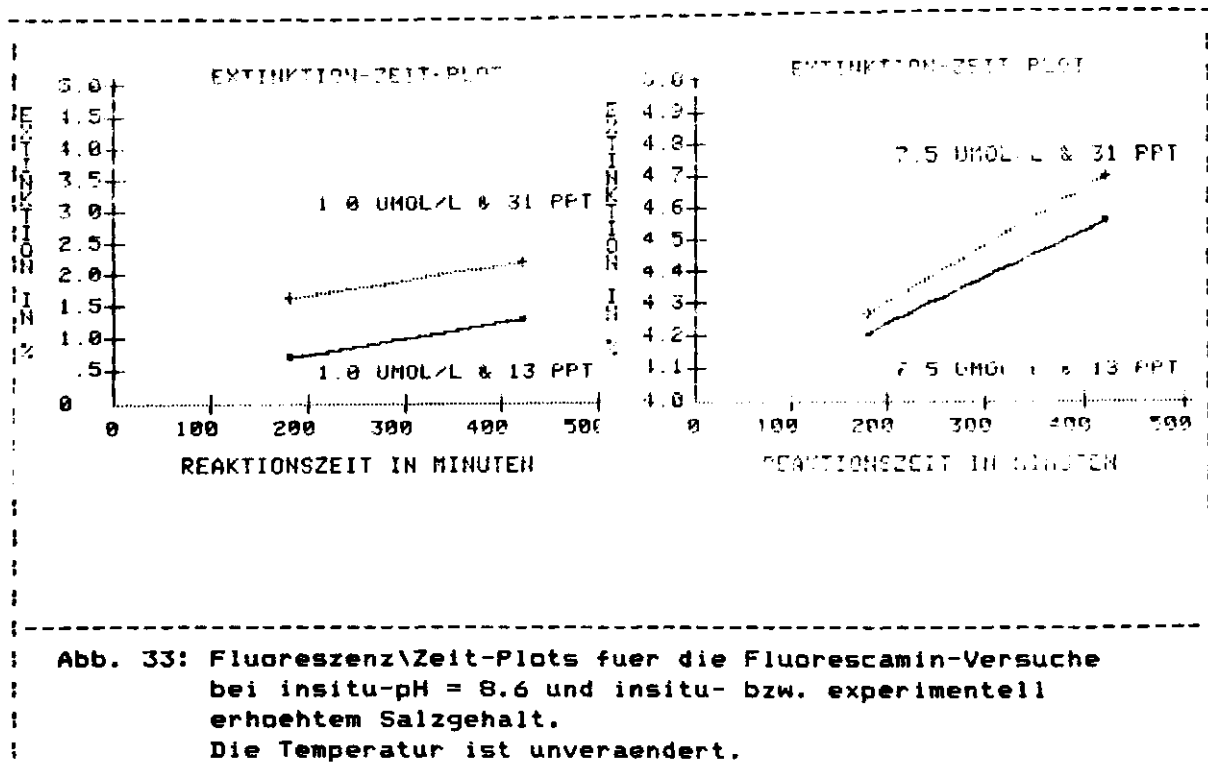


Abb. 30: Fluoreszenz\Zeit-Plot fuer insitu pH = 8.6 und fuer einen experimentell erhoeheten pH = 10.6; MUF-Leucin. der Salzgehalt und die Temperatur sind unveraendert.





Vergleicht man die Substrat-Saettigungskurve von insitu-Probe und Probe mit experimentell veraendertem pH-Wert bei insitu-Temperatur und insitu-Salzgehalt, so zeigt sich, dass die geforderte Substrat-Saettigungskurve nicht gegeben ist. Die Ursache hierfuer ist ungeklaert. Fuer niedrige Konzentrationen laesst sich jedoch ableiten, dass in diesem Fall sowohl fuer pH-Er hoehung als auch fuer pH-Erniedrigung ein starker Rueckgang der Aktivitaet zu verzeichnen ist. Ein scheinbar geringerer Aktivitaets-rueckgang bei pH-Erniedrigung ist allerdings nicht gesichert festzustellen.

Tab. 16 gibt die Werte von [S] und V₂ fuer die Substrat-Saettigungskurven wieder; auf eine statistische Analyse der Daten wird in Anbetracht der schwer zu interpretierenden Werte verzichtet.

I [S]	I	SALZGEHALT = 13 *10 ⁻³			I MW	I SD	I
I [UG C/L]	I	pH			I pH +/-	I pH +/-	I
I	I	8.60	10.60	6.60	I	I	I
I	I				I	I	I
I 36	I	0.6892	0.0668	0.1908	I 0.1298	I 0.086	I
I 72	I	1.2192	0.1622	0.2194	I 0.1908	I 0.040	I
I 108	I	1.5757	0.1956	0.4722	I 0.3339	I 0.196	I
I 144	I	2.3420	0.1717	0.5820	I 0.3769	I 0.290	I
I 216	I	2.1893	0.2433	0.5581	I 0.4007	I 0.223	I
I 540	I	1.7887	0.5295	0.5056	I 0.5176	I 0.017	I
I 1440	I	0.7107	0.7780	2.4374	I 1.6077	I 1.173	I
I-----I							
I Tab. 16: V2-Werte aus den Substrat-Saettigungskurven V2\[S] fuer I							
I MUF-Leucin in Abhaengigkeit von Versuchs-pH-Werten bei I							
I konstanter Versuchstemperatur und konstantem Salzgehalt I							
I gemessen im Juni 1983 mit Wasser aus der Kieler Foerde. I							
I V2= [ug C / L / h]. I							
I-----I							

Berechnet man fuer die obigen Daten das HANES-PLOT, ergeben sich die in Tab. 17 dargestellten Daten.

Die HANES-PLOTS fuer die jeweiligen pH-Werte mit insitu-Temperatur und insitu-Salzgehalt sind in Abb. 34 dargestellt. Auf eine statistische Betrachtung der HANES-Daten wird auch in der nachfolgenden Tabelle verzichtet, da bereits eine Interpretation der Substrat-Saettigungskurven bei dem vorliegenden Material schwer moeglich ist.

I [S]	I	SALZGEHALT = 13.0 * 10 ⁻³			I
I [UG C/L]	I	pH = 8.6	pH = 10.6	pH = 6.6	I
I	I				I
I 36	I	52.2307	539.0958	188.6835	I
I 72	I	59.0559	443.9613	328.1453	I
I 108	I	68.6122	552.2445	228.7073	I
I 144	I	61.4855	838.5935	247.4538	I
I 216	I	98.6580	887.9226	387.0432	I
I 540	I	301.8937	1019.9110	1068.0201	I
I 1440	I	2026.1320	1875.1159	590.7900	I
I-----I					
I Tab. 17: [S]/V2-Werte aus dem HANES-PLOT ([S]/V2\[S]) fuer MUF-					
I Leucin in Abhaengigkeit vom pH-Wert bei insitu-Salzgehalt I					
I und insitu-Temperatur, gemessen im Wasser der Kieler I					
I Foerde im Juni 1983; I					
I-----I					

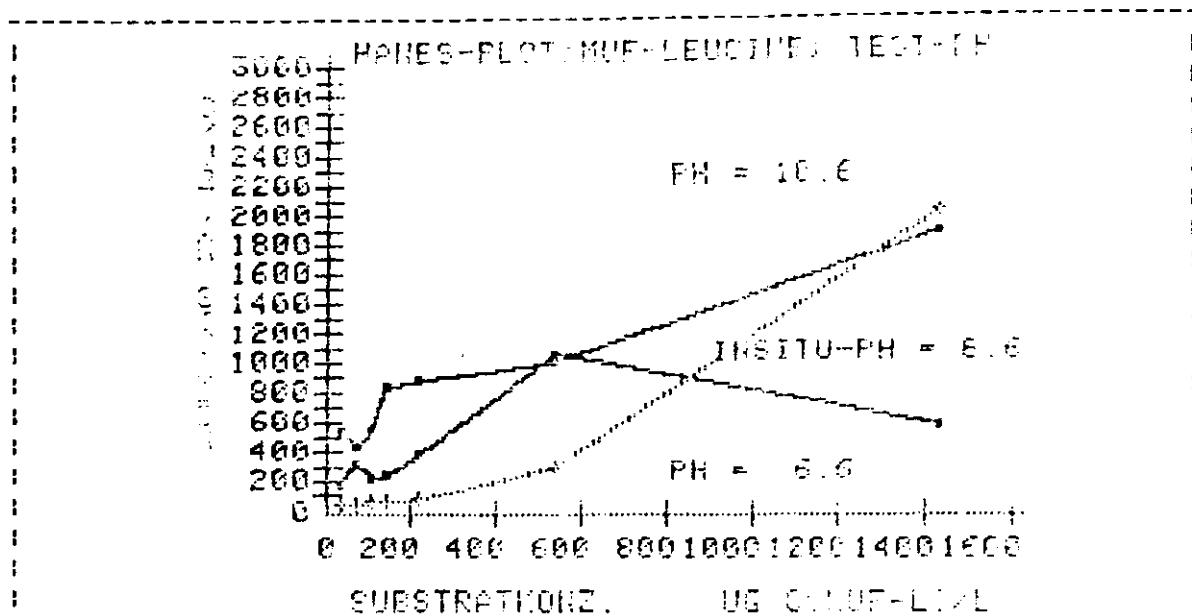


Abb. 34 HANES-PLOT fuer die pH-Werte 8.6 (insitu), 10.6 (experimentell erniedrigt) und 6.6 (experimentell erhoeht) bei insitu-Temperatur und insitu-Salzgehalt. MUF-Leucin. Fuer diese Plots wurden keine Regressionskurven berechnet.

Wie aus Tab. 17 sowie der Abb. 34 ersichtlich ist, folgen diese Kurven keinem der vorstehend genannten Regressionsmodelle. Aus diesem Grund ist eine weitere Interpretation der Ergebnisse wenig sinnvoll.

3.2.5 : Ergebnisse der fluoreszenzmikroskopischen Auswertung der Proben mit insitu-Salzgehalt und experimentell veraendertem Salzgehalt:

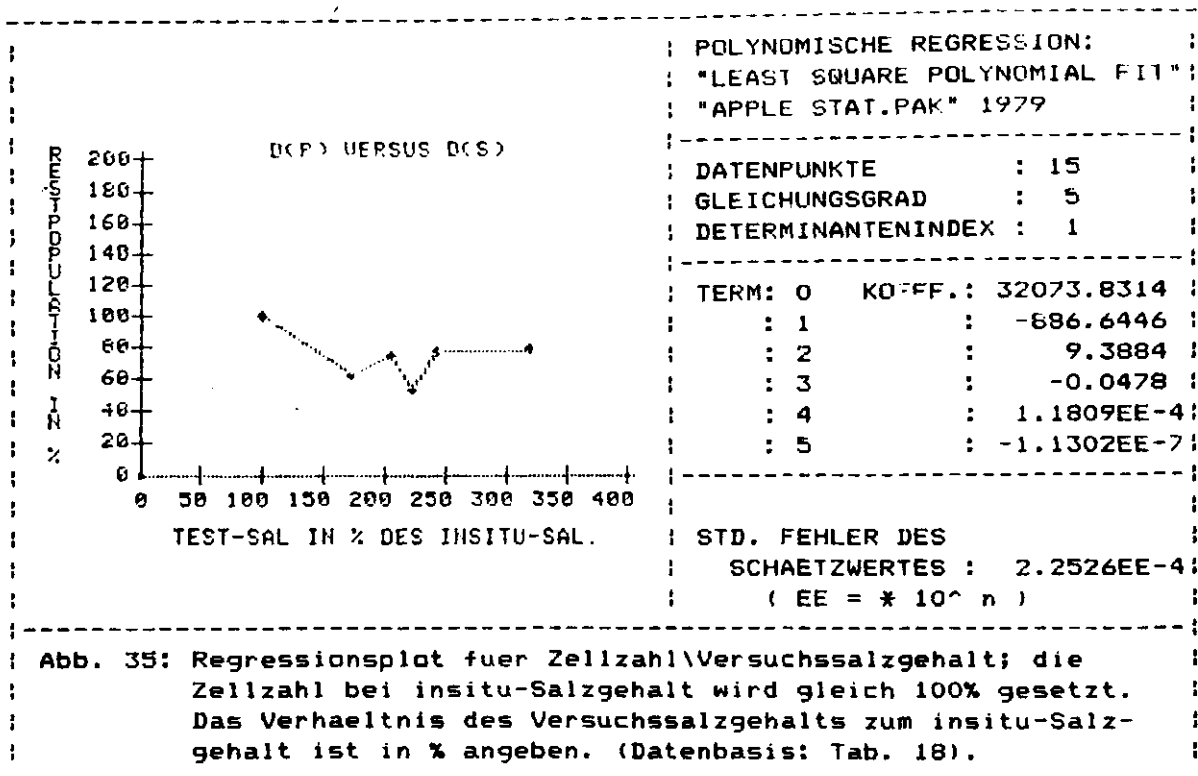
Zur Kontrolle der Ergebnisse der MUF-Leucin-Versuche mit insitu-Salzgehalt und experimentell erhoehetem Salzgehalt wurden jeweils am Ende der Messreihen Unterproben sowohl aus den unveraenderten Proben, als auch aus den Proben mit experimentell schnell erhoehetem Salzgehalt genommen und nach 3 minuetiger Faerbung mit Acridinorange ueber ein Nucleopore-Filter filtriert (FRANCISCO ET AL, 1973; HOBBIE ET AL, 1977). Dieses Filter wurde dann anschliessend unter einem Epifluoreszenz-Mikroskop bei 1250-facher Vergraesserung ausgewertet.

Tab. 18 gibt die gefundenen Bakterienzahlen wieder.

SALZGEHALT I	ZELLZAHL I	SALZGEHALT I	ZELLZAHL I	(%) I	(%) I
[*10^-3] A I	PRO ML I	[*10^-3] B I	PRO ML I	SG I	ZELLZ. I
INSITU-SALZGEHALT I	SG. EXPERIMENTELL ERHOEHT I	B/A I	(V/I) I		
----- I	----- I	----- I	----- I	----- I	----- I
----- I	----- I	31.00 I	263142 I	--- I	---- I
12.18 I	461042 I	38.93 I	364538 I	320 I	79.1 I
12.08 I	1776988 I	24.74 I	1337221 I	205 I	75.3 I
11.45 I	165911 I	19.74 I	104967 I	172 I	63.1 I
13.34 I	320753 I	32.40 I	246901 I	243 I	77.0 I
13.54 I	461230 I	30.07 I	249192 I	222 I	54.0 I
----- I					
Tab. 18: Zellzahlen in Proben aus der Kieler Foerde im Juni 1983; I					
vergleichend dargestellt sind Proben mit insitu-Salzgehalt I					
und Proben mit experimentell schnell erhoehetem Salzgehalt. I					
V/I = {Zellzahl(Versuchs-SG) / Zellzahl(insitu-SG)} * 100 I					
----- I					

Die gefundenen Bakterienzahlen sowohl fuer insitu- als auch fuer erhoehrte Salzgehalte sind mit Ausnahme eines Wertes um eine Zehnerpotenz niedriger als die von anderen Autoren in der Kieler Foerde gemessenen und veroeffentlichten Daten. Da jedoch alle Auszaehlungen von einer Person durchgefuehrt wurden, duerfte der individuelle Zaehlfehler fuer alle Proben etwa gleich sein und somit relative Vergleiche zwischen den Einzelwerten zulaessig sein.

Ausgehend von der Annahme, dass im Vergleich zu den Proben mit insitu-Salzgehalt in den Proben mit erhoehetem Salzgehalt eine parallele Entwicklung der Bakterienpopulation verlaeuft, die nur durch den einen veraenderten Parameter 'Salzgehalt' beeinflusst wird, zeigen die o. g. Ergebnisse eine generelle Abnahme der Zellzahlen mit zunehmendem Salzgehalt. Abb. 35 stellt die Daten nochmals in Form eines Regressionsplots dar; die durchgefuehrte Regression ist eine polynomische Regression nach der Methode der kleinsten Fehlerquadrate. Der theoretische Datenpunkt (100%-Sal.; 100%-Zellz.) wurde 10-fach, die weiteren Datenpunkte 1-fach gewichtet.



Die polynomische Regression weist ein extrem hohes Signifikanzniveau auf, was fuer eine mathematisch sinnvolle Korrelation spricht. Ob diese Korrelation oekologisch sinnvoll ist, ist jedoch nicht gesichert und auch aufgrund der geringen Anzahl der Datenpunkte nicht nachzuvollziehen.

Mit Sicherheit laesst sich nur feststellen, dass in einer Brackwasserregion mit ueberwiegendem Anteil an Brackwasserbakterien eine Abnahme der Zellzahl zu erwarten ist, wenn eine extreme Zunahme des Salzgehaltes stattfindet. Da diese Brackwasserbakterien ihr Optimum bei Salzgehalten um $8 \cdot 10^{-3}$ haben, ist ein Rueckgang der Zellzahl bedingt durch eine Inaktivierung der Brackwasserarten zu erklaren. Marine Bakterien mit Salzgehaltsoptima bei bei Salzgehalten ueber $20 \cdot 10^{-3}$ koennen sich unter den o. g. Bedingungen aber unter Umstaenden besser entwickeln, so dass der Prozess der Zellzahlabnahme durch ein besseres Wachstum der marinen Bakterien z.T. kompensiert werden kann.

4.0 : DISKUSSION:

Der extrazellulaere enzymatische Abbau von polymeren oder oligomeren Naehrstoffen kann mit Hilfe von Modellsubstanzen gemessen werden. Zur Anwendung der Abbauraten bei verschiedenen Substratkonzentrationen bedient man sich ueblicherweise der MICHAELIS-MENTEN Kinetik.

Wie aus den Vorversuchen bereits ersichtlich wird, zeigen natuerliche pelagische Mikroorganismen-Populationen gegenueber fluoreszenz-tracer-markierten Modellsubstraten (MUF-Substrate) aber oft ein vom theoretischen Modell der MICHAELIS-MENTEN-KINETIK abweichendes Umsatzverhalten. So entspricht die Fluoreszenzzunahme im Fluoreszenz\Zeit-Plot oft nicht der geforderten logarithmischen Kurve (WILLIAMS, 1972). Zum Teil treten aber auch innerhalb einer Probe bei verschiedenen Substrat-Konzentrationen stark unterschiedliche Eigenfluoreszenz-Werte auf, was zu einer grossen Schwankungsbreite der 'Baseline' fuehrt.

Da das MICHAELIS-MENTEN-MODELL jedoch nur die Zunahme der Fluoreszenz pro Zeiteinheit (= Abspaltung des Fluoreszenz-Tracers = Umsetzung des Substrates) betrachtet, werden diese Schwankungen in der 'Baseline' nicht beruecksichtigt. Hierbei koennen im Einzelfall vor allem dann erhebliche statistische Unschaerfen bei der Ermittlung der Regressionsgeraden in den Fluoreszenz\Zeit-Plots auftreten, wenn nur eine geringe Anzahl von Datenpunkten zur Verfuegung steht. Diese statistische Unschaerfe fuehrt dann auch bei der Erstellung der Substrat-Saettigungskurven zu erneuten Problemen.

Bei den vorstehend dargestellten Versuchen zeigte sich ein weiteres Problem bei der Erstellung der Substrat-Saettigungskurven: Fuer die niedrigen Substat-Konzentrationen zeigte sich in den $V_2/[S]$ -Plots durchwegs eine hochsignifikante potentielle Regressionskurve, waehrend die geforderte logarithmische Kurve nur mit einer ueber 5 prozentigen statistischen Unsicherheit angenommen werden kann. Die beiden Regressionskurven sind in allen Faellen hochsignifikant unterschiedlich.

Dies bedeutet, dass die Substrat-Saettigungskurven unter mathematisch-statistischer Betrachtung keine maximale Saettigungskonzentration und damit auch keine maximale Reaktionsgeschwindigkeit zulassen.

In gleicher Weise gilt dies fuer die HANES-Plots, die als Ableitung der Substrat-Saettigungskurven nach der maximalen Geschwindigkeit zu betrachten sind.

Dies bedeutet, dass das MICHAELIS-MENTEN-MODELL in diesem Fall zwar mit einem gewissen Fehler den vor Ort gemessenen Werten sehr nahe kommt, aber besonders fuer geringe Substrat-Konzentrationen starke Abweichungen auftreten, die aber oekologisch von besonderer Bedeutung sind, da sie zu einer Ueberschaetzung von K_m (MICHAELIS-MENTEN-KONSTANTE) und Turnover-Zeit bzw. zu einer Unterschaeetzung von V_{max} fuehren.

Aehnliche Schwierigkeiten sind bereits von mehreren Autoren beschrieben worden, die sich im Gegensatz zur extrazellulaeren enzymatischen Aktivitaet mit der Aufnahme geloester organischer Substanzen beschaeftigt haben.

BURNISON & MORITA (1974) haben in ihrer Arbeit ueber die natuerliche Substrat-Konzentration $[S_n]$ von Aminosaeuren 16 verschiedene Aminosaeuren in Lake Klameth, Oregon chemisch gemessen und gleichzeitig $(K_t + S_n)$ bestimmt. Sie fanden, dass $[S_n]$ generell groesser war als $(K_t + S_n)$ und schlugen als Loesung vor, dass eventuell ein Teil der Aminosaeuren an Partikeln adsorbiert wird und dadurch der bakteriellen Aufnahme entzogen wird. In neueren daenischen Arbeiten (Joergensen, 1984) wurden allerdings mit verbesserten chemisch-analytischen Methoden geringere $[S_n]$ Werte gemessen. Es ist jedoch nicht gesichert, ob $(K_t + S_n)$ dann groesser als $[S_n]$ ist.

DAWSON & GÖCKE (1969) fanden die gleiche Diskrepanz fuer die Aufnahmekinetiken von Glucose und Aminosäuren in der Ostsee und der Kieler Förde, während andere ueber nichtlineare Kinetiken bei Zuckern und Aminosäuren (VACCARO & JANNASCH, 1967; MUNRO & BROCK, 1968; HAMILTON & PORESŁAN, 1970; CRAWFORD ET AL., 1974; BARVENIK & MALLOY, 1979) berichteten. AZAM & HODSON (1984) berichten, dass nach ihrer Erfahrung nichtlineare Plots sehr verbreitet, wenn nicht gar die Regel sind.

Die Ursachen hierfür sind bereits von mehreren Autoren diskutiert worden. So zeigte WILLIAMS (1973) mit Hilfe eines mathematischen Modells, dass eine heterogene Population von Mikroorganismen bei geringen Substratkonzentrationen nicht der MICHAELIS-MENTEN-GLEICHUNG folgt und die beobachteten Turnover-Raten hoeher sind als die vorhergesagten Raten. In einem mathematischen Modell mit variabler Artenzahl N und verschiedenen Werten fuer K_m und V_{max} zeigt er, dass die Beziehung zwischen $[S]$ und $[S]/V_2$ dann curvilinear ist, wenn $N > 10$ ist. Weiter nimmt WILLIAMS an, dass die Curvilinearitaet bereits bei $N = 2$ beginnen koennte. Er kommt zum Schluss, dass erst ab Substrat-Konzentrationen von $[S] > 4 \cdot K_m$ eine gute Uebereinstimmung des MICHAELIS-MENTEN-MODELLS mit den Messwerten aus einer Mischpopulation auftritt und bei geringeren Substratkonzentrationen ein Parameter wie K_m nicht die gleiche Bedeutung hat, wie K_m in einer "Ein-Enzym-Ein-Substrat-Reaktion"; K_m muss in diesem Zusammenhang als oekologischer Parameter gewertet werden, der im direkten Zusammenhang mit der gemessenen Population steht.

KRAMBECK (1979) zeigt, dass die MICHAELIS-MENTEN-GLEICHUNG "die Kinetik einer mikrobiellen Population theoretisch nur dann approximiert, wenn sich verschiedene, einander entgegengesetzte Abweichungstrends die Waage halten, die auf der Ebene von Diffusionsflüssen, Enzymketten und Netzwerken, Kulturen und Populationen abgeleitet werden" und kommt zur Schlussfolgerung, dass "kinetische Werte wie maximale Aufnahmegeschwindigkeit, Turnover-Zeit und die Summe aus Halbsaettigungskonstante und natuerlichen Substratkonzentrationen nur Vergleiche verschiedener Trophiestufen und eine Abschaetzung (bestenfalls) der Groessenordnung von tatsaechlichen Umsatzraten spezieller Substrate" erlauben.

Vergleicht man die Ergebnisse dieser Arbeit mit den o. g. Sachverhalten, so koennen bezueglich der Abweichung der HANES-Plots vom linearen Regressionsmodell bei geringen Substrat-Konzentration aehnliche Verhaeltnisse dargestellt werden. Erst ab 20 μmol MUF-Leucin/L kann eine Linearitaet angenommen werden.

Variiert man aber einen oekologischen Parameter (Salzgehalt, Temperatur oder pH-Wert), so zeigt sich eine meist nur geringfuegig bessere Uebereinstimmung mit der MICHAELIS-MENTEN-GLEICHUNG. Dies kann auf verschiedene Prozesse zurueckzufuehren sein, die durch den mit der Veraenderung eines Umweltparameters verbundenen oekologischen Stress in einer Bakterienpopulation innerhalb einer Probe induziert werden.

So bewirkt eine schnelle Erhoehung des Salzgehaltes einer Brackwasserprobe wohl eine Verschiebung des Artenspektrums der Bakterien zugunsten mariner und halophiler Bakterien und zu ungunsten von Brackwasser-Bakterien mit niedriger Salzgehaltstoleranz. Durch Zugabe hoher Substrat-Konzentrationen kann vermutlich gleichzeitig ein staerkeres Wachstum induziert werden als durch Zugabe geringerer Substrat-Konzentrationen, wodurch einheitlichere Verhaeltnisse in einer Probe entstehen, als dies im natuerlichen Medium der Fall ist.

Die Ergebnisse der Versuche mit veraendelter Temperatur zeigen ein aehnliches Ergebnis, jedoch mit ausgepraegterer Wirkung. Durch die Temperaturerhoehung um + 10 Grad Celsius erhoeht sich die Enzymkinetik nach der RGT-Regel um 100%; diejenigen Bakterienarten, die in der Lage sind, schnelle Umsetzungen mit ihrem Enzymbesteck vorzunehmen, erhalten so die

Möglichkeit, einen wesentlichen Einfluss auf die Turnover-Zeit zu nehmen, was eine Linearisierung der HANES-Plots bewirkt. Unter der Berücksichtigung der Ergebnisse von Williams (1973) kann so die Abweichung der Messwerte von der MICHAELIS-MENTEN-GLEICHUNG ein Mass fuer die Arten-Diversitaet sein. Diese These unterstuetzen unsere Ergebnisse der Zellzahlen-Analyse insofern, da eine signifikante Abnahme der Zellzahlen mit zunehmender Veraenderung des Salzgehaltes gezeigt werden konnte.

Es laesst sich also folgendes feststellen:

Erst bei relativ hohen Substrat-Zugaben ueber 20 $\mu\text{mol/L}$ kann ein lineares HANES-Plot angenommen werden. Bezieht man kleinere [S]-Werte in die HANES-Plots ein, so werden diese curvilinear, wobei eine Potenzkurve fuer MUF-Leucin signifikant vorkommt. Geht man dennoch von einer linearen Interpolation fuer K_m aus, so unterschaezt man V_{max} und die Turnover-Rate u. U. erheblich.

Eine Veraenderung des natuerlichen Milieus einer bakteriellen insitu-Population nimmt einen Einfluss auf die Kinetik und auch auf die Artenzusammensetzung; diese wiederum bewirkt ein 'feed-back' auf die Kinetik. Die Beeinflussung durch die Veraenderung des natuerlichen Salzgehaltes ist wesentlich geringer als durch Veraenderung der Temperatur und des pH-Werts.

Die einzelnen Versuche geben z. T. Hinweise darauf, dass in einer Probe mindestens 2 Gruppen von Bakterien mit verschiedenen oekologischen Anspruechen bezueglich des Salzgehaltes und der Substrat-Konzentration vorhanden sind, was die Beeinflussung des MICHAELIS-MENTEN-MODELLS durch die Arten-Diversitaet in einer Probe befuerwortet.

Da diese Hypothese allerdings sehr umstritten ist, kann fuer einen weiterfuehrenden alternativen Arbeitsansatz allerdings der Reaktionsraum um die Zellen nicht unberuecksichtigt bleiben.

Wie weit die HANES-Plots noch Geraden aehneln, wird alternativ auch davon abhaengen, wie sich die kinetischen Eigenschaften der Exoenzyme, der Substrataufnahme in die Zelle, eine moegliche Produkthemmung und die Abdiffusion der Monomeren aus dem Reaktionsraum um die Zelle bei verschiedenen Einfluessen gegeneinander verschieben. Der Diffusionsverlust wird dann ins Gewicht fallen, wenn die Produkt-Konzentration ansteigt. Bei sehr hohen Substrat-Konzentrationen wird sich eine Produkt-Konzentration einspielen, bei der die Reaktionsgeschwindigkeit der Exoenzyme die biologische und die diffusionsbedingte Entfernung der Monomeren gerade ausgleicht.

Bei abrupt erhoehetem Salzgehalt wird sicher die Aufnahmefaehigkeit der Zellen leiden, so dass die Kinetik der Diffusionsverluste das Bild bestimmt, waehrend bei Temperaturerhoehung der Zellstoffwechsel zur wesentlichen Reduzierung der Monomeren beitraegt.

5.0 : SUMMARY:

The extracellular enzyme activity of marine pelagic microorganisms causes filling up of the 'pool' of monomer and polymer organic compounds in the water by hydrolysis.

Recently, this process can be measured under 'in-situ' conditions by using fluorochromic Substrates. (HOPPE, 1983).

Therefore the production of oligomolecular chemical compounds can be compared with the bacterial uptake of these substrates, which are measured with radiotracer techniques. (VACCARO & JANNASCH, 1966)

The mathematical interpretation of the measurements often showed non-linearity of the HANES-Plots ($[S]/V_2 \backslash [S]$), as discussed by various authors with regard to the conditions of molecular substrate uptake under different aspects.

(WILLIAMS, 1973, AZAM & HODSON, 1981, and KRAMBECK, 1979).

As reported in this paper, the nonlinearity of the HANES-Plots under fast experimental changes of the salinity was not as significant as before or particularly no longer existent.

The use of different statistic regression models showed, that the nonlinearity of the HANES-Plots in the range of the lower substrate concentrations was less significant by changing the salinity experimentally very quick.

Almost linear HANES-Plots were only achieved by higher temperatures.

This result is discussed as an effect of mortality induced reduction of the number microorganism-species in the brackish water, which are not able to adapt to marine osmotic conditions in short times.

ZUSAMMENFASSUNG:

Die extrazellulaere Enzymaktivitaet mariner-pelagischer Mikroorganismen bewirkt durch die Hydrolyse polymerer Verbindungen ein Auffuellen des 'pools' monomerer und oligomerer Substanzen im Wasser.

Dieser Prozess kann seit kurzem mit Hilfe von fluorochromierten Modellsubstraten unter 'in-situ' Bedingungen gemessen werden. (HOPPE, 1983).

Die Produktion niedermolekularer chemischer Verbindungen kann damit durch die bakterielle Aufnahme dieser Stoffe, die mit Radio-Tracer-Methoden gemessen wird, verglichen werden. (VACCARO & JANNASCH, 1966)

Bei der mathematischen Auswertung der Messwerte treten jedoch haeufig Unregelmassigkeiten (Nichtlinearitaet) in der graphischen Darstellung ($[S]/V_2 \backslash [S]$; HANES-PLOT) auf, die im Hinblick auf die Verhaeltnisse bei der molekularen Stoffaufnahme bereits von mehreren Autoren unter verschiedenen Gesichtspunkten betrachtet und interpretiert wurden; (WILLIAMS, 1973 und AZAM & HODSON, 1981, sowie KRAMBECK, 1979).

Die Benutzung verschiedener statistischer Regressionsmodelle zeigte, dass die oft auftretende Nichtlinearitaet der HANES-Plots im Bereich der niedrigen Substratkonzentrationen durch abrupte experimentelle Erhoehung des Salzgehaltes geringfuegig abgeschwaecht wird.

Annaehernd lineare HANES-Plots ergeben sich allerdings nur bei Temperaturerhoehung. Dieses Ergebnis wird diskutiert als Auswirkung einer mortalitaetsbedingten Erniedrigung der Artenzahl der Mikroorganismen im Brackwasser, die nicht die Faehigkeit zur Kurzzeit-Anpassung an marine osmotische Verhaeltnisse haben.

6.0 : DANKSAGUNG:

Wir moechten wir uns besonders bei der Abt. Marine Mikrobiologie des Inst. f. Meereskunde in Kiel fuer die Bereitstellung der Arbeitsplaetze und der Geraete und finanzieller Mittel, sowie fuer die freundliche Unterstuetzung bei den Laborarbeiten und die stetige Hilfsbereitschaft bedanken.

Weiter gilt unser Dank Herrn und Frau Dr. Krambeck (Max-Planck Institut fuer Limnologie in Ploen) sowie Herrn Dr. L.-A. Meyer-Reil (Institut fuer Meereskunde, Kiel) fuer die kritische Durchsicht des Manuskripts und der hilfreichen Diskussionsbeitraege.

2.0 : LITERATURE:

- Azam, F., and Hodson, R.E., 1981. Multiphasic kinetics for d-glucose uptake by assemblages of natural marine bacteria. UCSD 10P20-390; submitted to: Mar. Ecol. Prog. Ser.
- Barvenik, F.W., and Malloy, S.C. (1979). Kinetic patterns of microbial amino acid uptake and mineralization in marine waters. Estuarine Coastal Mar. Sci. 8: 241-250;
- Burnison, B.K., and Morita, R.Y., (1974). Heterotrophic potential for amino acid uptake in a naturally eutrophic lake. Appl. Microbiol. 27: 488-495;
- Burns, R.G., (1980). Microbial adhesion to soil surfaces: Consequences for growth and enzyme activities. In: Microbial adhesion to surfaces. Chapter 14. R.C.W. Berkely, J.M. Lynch, J. Melling, P.R. Rutter, and B. Vincent [eds.]; Symposium of the Society of Chemical Industry and the Society for General Microbiology. Univ. of Reading;
- Burton, G.A., Jr., and Lazorchak, J.M. (1983). Substrate associated microfauna. J. Water Poll. Contr. Fed. 55: 863-869
- Crawford, C.C., Hobbie, J.E., and Webb, K.L., (1974). The utilization of dissolved free amino acids by estuarine microorganisms. Ecology 55: 551-563;
- Dawson, R., and Gocke, K., (1978). Heterotrophic activity in comparison to the free amino acid concentrations in the Baltic Sea water samples. Oceanol. Acta 1: 45-54;
- Francisco, D.E., Mah, R.A., Rabin, A.C., (1973). Acridine orange epifluorescence technique for counting bacteria. Trans. Am. Micros. Soc. 92: 416-421;
- Hamilton, R.D., and Preslan, J.E. (1970); Observations on heterotrophic activity in the eastern tropical Pacific. Limnol. Oceanogr. 15: 395-401;
- Hobbie, J.E., Daley, R.J., and Jasper, S., (1977). Use of nucleopore filters for counting bacteria by fluorescence microscopy. Appl. Environ. Microbiol. 33: 1225-1228;
- Hoppe, H.G., (1983). Significance of exoproteolytic activities in the ecology of brackish water: measurements by means of methylumbelliferyl-substrates. Mar. Ecol. Prog. Ser. 11: 299-308;
- Joergensen, N.O.G., (1984; in press). Are dissolved free amino acids free? Microbial Ecology;
- Kim, J., and ZoBell, C.E., (1974). Occurrence and activities of cell-free enzymes in oceanic environments. In: Effect of the ocean environment on microbial activities, pp 368-385; R.R. Colwell & R.Y. Morita [eds.]; Univ. Park Press;
- Kim, S.J., (1983) in press. Significance of attached bacteria in the cycle of organic matter in aquatic environments. Diss. Univ. Kiel.

- Kim, S.J. & Hoppe, H.G., (1985) in press. Microbial extracellular enzyme detection on agar plates by means of fluorogenic methyl-umbelliferyl-substrates.
Proc. 2nd. Int. Coll. Marine Bacteriology, Brest; France
- Krambeck, Ch. (1979). Applicability and limitations of the Michaelis-Menten equation in microbial ecology.
Arch. Hydrobiol. - Beih. Ergebn. Limnol. 12: 64-76;
- Michaelis, M., and Menten, M.L., (1913). Kinetics of invertase action.
Z. Biochem. 49: 333;
- Morris, J.G., (1976). Physikalisches Chemie fuer Biologen, pp 282-288;
Uebers. von A.Hoepfner;
Verlag Chemie
- Munro, A.L.S., and Brock, T.D., (1968). Distinction between algal and bacterial utilization of soluble substances in the sea.
J. Gen. Microbiol. 51: 935-942;
- North, B., (1975). Primary amines in California coastal waters:
Utilization by phytoplankton.
Limnol. Oceanogr. 20 (1): 20-27;
- Pfaender, P. (1982). Enzyme. Bezugsquellen, Daten, Eigenschaften,
pp 4-58.
Gustav Fischer
- Pollock, M.R., (1962). Exoenzymes.
In: The Bacteria, Vol. 4: pp 121-178;
C. Gunsalus & R.Y. Stanier [eds.]; Academic Press;
- Priest, F.G., (1984). Extracellular Enzymes.
p 1-79;
Van Nostrand Reinhold (UK) Co. Ltd.
- Rheinheimer, G., (1968). Beobachtungen ueber den Einfluss von Salzgehaltsschwankungen auf die Bakterienflora der westlichen Ostsee.
Sarsia 34: 253-262;
- Rheinheimer, G., (1971). Ueber das Vorkommen von Brackwasserbakterien in der Ostsee.
Vie et Milieu 22: 281-291;
- Smith, D.F., Wiebe, W.J., Higgins, H.W., (1984). Heterotrophic potential estimates: an inherent paradox in assuming Michaelis-Menten kinetics.
Mar. Ecol. Prog. Ser. 17: 49-56;
- Somville, M., Billen, G. (1983). A method for determining exoproteasic activity in natural waters.
Limnol. Oceanogr. 28: 190-193;
- Struegger, S. (1949). Fluorescent microscope examination of bacteria in soil.
Can. J. Res. 26: 288;
- Tatzl, G. (1982). Optigress - Ein Multifunktionsprogramm.
PPX Software Magazin 4(2): 12-19;
- Udentriend, S., et al., (1972). Fluorescamine: a reagent for assay of amino acids, peptides, and primary amines in the picomole range.
Science 178: 871-872;

- Vaccaro, R.F., and Jannasch, H.W., (1966). Studies on heterotrophic activity in seawater based on glucose assimilation.
Limnol. Oceanogr. 11: 596-607;
- Vaccaro, R.F., and Jannasch, H.W., (1967). Variations in uptake kinetics for glucose by natural populations in seawater.
Limnol. Oceanogr. 12: 540-542;
- Van Es, F.B., and Meyer-Reil, L.A., (1982). Biomass and metabolic activity of heterotrophic marine bacteria.
Adv. Microbial Ecol. 6: 111-169;
- Weigle, M., DeBernardo, S.L., Teng, J.P., & Leimgruber, W., (1972). A novel reagent for the fluorometric assay of primary amines.
J. Am. Chem. Soc. 94: 5927- 5928;
- Williams, P.J. LeB., (1973). The validity of the application of simple kinetic analysis to heterogeneous microbial populations.
Limnol. Oceanogr. 18: 159-165;
- Zimmermann, R., and Meyer-Reil, L.A., (1974). A new method for fluorescence staining of bacterial populations on membrane filters.
Kieler Meeresforsch. 30: 24-27;
- Zobell, C.E. (1946). Marine Microbiology;
Chronica Botanica.
Waltham, Mass.